

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Restitution kaltischämisch
vorgeschiedigter Rattenmyokardzellen
mit verschiedenen Konservierungsverfahren**

STEPHANIE VOLK

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Restitution kaltischämisch
vorgeschiedigter Rattenmyokardzellen
mit verschiedenen Konservierungsverfahren**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Stephanie Volk

aus Lahn-Giessen

Giessen, 2006

Aus dem Physiologischen Institut

Direktor: Prof. Dr. Dr. H.M. Piper
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Bauer

Tag der Disputation: 29.06.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Transplantationen.....	1
1.2 Herztransplantationen	3
1.3 Konservierungslösungen.....	3
1.4 Kälteschädigung.....	6
1.4.1 Problematik der kaltischämisch vorbehandelten isolierten Myokardzellen.....	7
1.4.2 Die Bedeutung der Sauerstoffradikale	7
1.4.3 Trolox als Konservierungslösung	9
1.4.4 Radikalfänger.....	11
1.5 Experimentelles Modell	12
1.6 Ziel der Arbeit	14
2 Material	15
2.1 Allgemeine Chemikalien.....	15
2.2 Spezielle Chemikalien	15
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	16
2.3.1 Zellkulturmedien.....	16
2.3.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation.....	17
2.3.3 Zusammensetzung der Konservierungslösungen	18
2.4 Geräte und Laborbedarf	19
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur.....	19
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellkontraktion ..	19
2.4.3 Sonstige Geräte	19
2.4.4 Verbrauchsmaterialien	20
2.4.5 Software.....	20

3 Methoden	21
3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen.....	21
3.1.1 Versuchstiere	21
3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten.....	21
3.1.3 Zellkultur	22
3.1.4 Myozytenlagerung.....	23
3.2 Versuchsgruppen	23
3.2.1 HTK als Konservierungslösung.....	23
3.3 Optische Instrumente zur Zellauszählung – Lichtmikroskopie.....	24
3.3.1 Probenvorbereitung	24
3.3.2 Gruppeneinteilung.....	24
3.4 System der Lichtmikroskopie.....	25
3.5 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld.....	26
3.5.1 Probenvorbereitung	26
3.5.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion....	27
3.5.3 Messung der Kontraktionsparameter	28
3.5.4 Messprotokoll.....	30
3.6 Apoptose und Nekrose.....	30
3.6.1 Definition und Bedeutung.....	30
3.6.2 Apoptoseinduktion	31
3.6.3 Parameter zur Messung der Apoptose	31
3.6.4 Datenerfassung.....	33
3.6.5 Statistik	33
4 Ergebnisse.....	35
4.1 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung	35
4.2 Einfluss von Trolox auf die kälteinduzierte Zellschädigung	37
4.3 Induktion von Apoptose durch Trolox bei Kälteinkubation.....	40
4.4 Einfluss der Wiedererwärmung von Trolox geschützten Kardiomyozyten.....	42
4.5 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die Herzmuskelzellen in Wärme.....	43
4.6 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung in HTK-Lösung	45
4.7 Einfluss der Wiedererwärmung in HTK-Lösung auf die Zellschädigung.....	47

4.8 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung in Na-Lösung	48
4.9 Einfluss von HTK- und Na-Lösung auf die Zellmorphologie	51
4.10 Einfluss von HTK- und Na ⁺ -Lösung auf die Zellfunktion	53
5 Diskussion	55
5.1 Diskussion der Fragestellung	55
5.2 Diskussion des angewendeten Versuchmodells	55
5.3 Möglichkeiten des Versuchsmodells	56
5.4 Diskussion der Hypothermie.....	58
5.5 Ziel dieser Studie.....	59
5.6 Eingesetzte Konservierungslösungen	59
5.6.1 Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) als Konservierungsmittel	60
5.6.2 Radikalfänger als Konservierungsmittel (Trolox).....	62
5.6.3 Eisenchelatoren als Konservierungsmittel (Desferal, LK 614 und LK 616).....	63
5.6.4 Einfluss von Natriumionen auf das Konservierungsverhalten	64
5.7 Diskussion der Hauptbefunde	66
5.8 Schlussfolgerungen aus den Experimenten	67
6 Zusammenfassung	68
7 Summary.....	70
Erklärung.....	78
Danksagung	79
Lebenslauf.....	80
Literaturverzeichnis.....	VIII

Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Ampère, Einheit der elektrischen Stromstärke
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	demineralisiertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
Hz	Frequenz in Hertz
Hz	Hertz
IU	Internationale Einheit
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
M	Mol, Einheit der Stoffmenge
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
NAC	N-Acetylcystein
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte

PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
TCA	Trichloressigsäure
U	Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
xg	x-fache Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der HTK-Bretschneider Lösung	23
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der verschiedenen Konservierungslösungen	25
Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glucosestoffwechsel der Myokardzelle, sowie wichtige Ionenkanäle	5
Abbildung 2: Bildung von Sauerstoffradikalen	9
Abbildung 3: α -Tocopherol	10
Abbildung 4: Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure).....	10
Abbildung 5: 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol.....	11
Abbildung 6: (R)-Trolox-methylether.....	11
Abbildung 7: Nekrotische Zellkörper Abbildung 8: Vitale Zellkörper	24
Abbildung 9: Übersicht: zeitlicher Ablauf der Auszählung	25
Abbildung 10: Zelldarstellung mittels Hoe-Färbung	32
Abbildung 11: Zelldarstellung mittels Durchlicht	33
Abbildung 12: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium	36
Abbildung 13: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium (Basalwerte)	37
Abbildung 14: Zellmorphologie nach 24-stündiger Kaltinkubation in CCT-Medium ..	38
Abbildung 15: Konzentrationswirkungskurve von Trolox	39
Abbildung 16: Einfluss von Trolox auf die Anheftung der Herzmuskelzellen	39
Abbildung 17: 24-stündige Kaltinkubation- und Warminkubation in Trolox.....	40
Abbildung 18: Konzentrationswirkungskurve von Trolox mittels HOE-Färbung.....	41
Abbildung 19: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium (HOE-Färbung).....	42
Abbildung 20: 24-stündige Kalt- und Warminkubation in Trolox	43
Abbildung 21: 24-stündige Warminkubation in CCT-Medium	44
Abbildung 22: 24-stündige Kalt- und Warminkubation in Trolox	46
Abbildung 23: 24-stündige Kaltinkubation in HTK-Lösung.....	46
Abbildung 24: 24-stündige Kaltinkubation in HTK-Lösung.....	47
Abbildung 25: Einfluss von Na^+ -Ionen bei 24-stündiger Kaltinkubation	49
Abbildung 26: Einfluss von Na^+ -Ionen bei einer 24-stündigen Kaltinkubation.....	50
Abbildung 27: Basalwerte bei 24-stündiger Kaltinkubation	51
Abbildung 28: Einfluss von Na^+ -Ionen bei 24-stündiger Kalt- und Warminkubation..	52
Abbildung 29: 24-stündige Warm- und Kaltinkubation.....	52
Abbildung 30: Einfluss von Na^+ -Ionen bei Kalt- und Warminkubation	54
Abbildung 31: Arrhenius-Gleichung	58

1 Einleitung

Seit rund 50 Jahren werden menschliche Organe erfolgreich transplantiert. Heute sind die meisten dieser Eingriffe technisch gesehen Routine. Das Hauptproblem ist der Mangel an Spenderorganen. Selbst wenn diese zur Transplantation freigegeben werden, muss es möglichst schnell und unversehrt zum Empfänger gelangen. Trotz bereits existierender Nährlösungen, in denen die Organe aufbewahrt werden, ist die Überlebenszeit außerhalb des Körpers nach Angaben des TPI (Transplant Information) im Jahr 2001 wenige Stunden: ein Herz etwa vier bis acht Stunden.

Die Grundlage der Transplantationsmedizin, ausgenommen aller Lebendspenden, ist der Tod, konkret nach der aktuellen Gesetzessprechung der Ganz-Hirntod eines Menschen.

Der Ganz-Hirntod definiert sich über die Totalnekrose des Gehirns, funktionell als vollständiges und endgültiges Erlöschensein der Funktionen des Gehirns infolge einer schweren Hirnschädigung, darstellbar als Nulllinien im EEG.

1.1 Transplantationen

Bereits in der frühen Geschichte der Medizin wurde den forschenden Medizinern bewusst, dass irreversibel geschädigte Organe, die ihre Funktion nicht mehr aufrecht erhalten konnten, durch den Ersatz eines neuen funktionstüchtigen Organs ersetzt werden könnten.

Im 20. Jahrhundert wurde durch eine intensive experimentelle Forschung der medizinische Fortschritt voran getrieben, so dass zu diesem Zeitpunkt ernsthaft an einer Weiterentwicklung und Verwirklichung von Organtransplantationen gearbeitet werden konnte.

Die Geschichte der Herztransplantation lässt sich bis an die Anfänge dieses Jahrhunderts zurückverfolgen. Um einen Überblick über die Grundzüge der Funktionen des Herzens zu erlangen, transplantierten Guthrie und Carell 1905 erstmals ein Tierherz (CARREL et al., 1905). In diesem Experiment gelang es den beiden Forschern den Kreislauf des Tieres nach über einer Stunde wieder

herzustellen und für ca. 2 Stunden aufrecht zu halten. 1964 wurde von Hardy erstmals eine orthotope Xenotransplantation durchgeführt (HARDY et al., 1964), in der von 1958 von Lower und Shumway beschriebenen Operationstechnik (LOWER et al., 1960).

Die erstmalig beschriebene orthotope allogene Herztransplantation wurde am 03.12.1964 in Kapstadt, Südafrika, von Professor Dr. Christian Barnard durchgeführt. Der Patient, Larry Washkansky, verstarb nach 18 Tagen. Auf zwei Jahre postoperative Überlebenszeit schaffte es Phil Blaiberg, der zweite von Barnard transplantierte Patient (BARNARD, 1967).

Trotz dieser anfänglichen Misserfolge gründeten Lower und Shumway von der Stanford University in Kalifornien, USA, das erste wissenschaftlich ausgerichtete Transplantationsprogramm herzinsuffizienter Patienten. Die Patientenzahlen der bis 1993 durchgeführten Herztransplantationen beliefen sich auf 792. Die mittlere Überlebensrate betrug 63% (LOWER et al., 1960).

Bis zum Jahre 1996 wurden bereits weltweit ca. 25000 Herzen transplantiert, im Schnitt ca. 2500 pro Jahr, im Jahre 1996 waren es 510 Herzen. Es besteht weiterhin ein Bedarf von ca. 1000 Herzen im Jahr, die Warteliste umfasst zu Zeit ca. 700 Patienten (SMITS et al. 2006).

Mit dem Fortschritt der Transplantationsmedizin wurden vornehmlich die Operationstechniken immer weiter verfeinert, ebenso die Vorgänge der Transplantationsimmunologie. In einer weiteren Phase der Entwicklung rücken die Vorgänge bzw. Techniken zur Gewebeprotektion in den Ischämiephasen während, bzw. nach der Organentnahme, bis zur Reperfusion des Organs nach erfolgter Transplantation im Empfängerorganismus in den Vordergrund.

Auf diesen Bereich konzentriert sich auch heute weiterhin die Forschung. Das Ziel ist eine schnelle und unkomplizierte Übertragung von Organen in das Empfängersystem.

1.2 Herztransplantationen

Die Organkonservierung stellt einen wichtigen Schritt in der Transplantationsmedizin dar. Ziel ist eine adäquate Konservierung des zu verpflanzenden Organs. Ein großes Problem stellt die sogenannte Ischämiezeit dar. Sie ist definiert als Zeitspanne, in der das potentielle Spenderorgan aus dem Spenderorganismus explantiert wird und im Empfängersystem mit der physiologischen Blutversorgung wieder eingesetzt wird. In dieser Zeit ist das Organ von jeglicher Blut- bzw. Nährstoffversorgung abgeschnitten. Des weiteren können anfallende bzw. sich anstauende, eventuell toxische Metabolite nicht abtransportiert werden.

1.3 Konservierungslösungen

Werden Organe zur Transplantation freigegeben, werden sie in weiteren Schritten aus dem Spenderorganismus explantiert, gekühlt, in Konservierungslösungen, gelagert und transportiert.

Hypothermie wird somit zur Lagerung von Zellgewebe eingesetzt, um das Gewebe vor den Folgen eines Sauerstoffmangels zu schützen. Doch bisherige Studien an Hepatozyten und Nierenzellen haben deutlich gezeigt, dass Kälte selbst eine erhebliche Zellschädigung verursachen kann (RAUEN et al, 1997). Während kardiale Kälteschädigungen auf Störungen der zellulären Ionenhomöostase mit nachfolgender Zellschwellung zurückgeführt wurde, konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass Hypothermie in verschiedenen Zelltypen eine kälteinduzierte Apoptose über reaktive Sauerstoffmoleküle auslöst (RAUEN et al, 1997). Kälte verursacht demnach eine Erhöhung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools. Folge dessen ist eine schnelle Erhöhung von Sauerstoffradikalen (RAUEN et al, 1997). Diese beschriebene sogenannte kälteinduzierte Apoptose, wurde in klinischen Studien bisher an Hepatozyten, Nierenzellen und verschiedenen Endothelzellen beobachtet und beschrieben. Dem Auftreten dieser kälteinduzierten Apoptose wird versucht entgegen zu wirken durch Verwendung intrazellulär wirkender Eisenchelatoren.

Der kardiale Konservierungsschaden hingegen bewirkt hauptsächlich einen Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff im Organ. Bei ischämischen Ereignissen (z.B. Myokardinfarkt, Operationen etc.) kommt es zu einer Unterbrechung der lebensnotwendigen Blutzufuhr und ein Mangel an Sauerstoff bewirkt primär ein

Erliegen des aeroben Stoffwechsels (oxidative Phosphorylierung, β -Oxidation), über den Weg der anaeroben Glykolyse, was eine intrazelluläre Azidose zur Folge hat (AMRANI et al., 1999). Durch eine vermehrte Bildung von Laktat, aufgrund der anaeroben Glykolyse und die angesprochene Hydrolyse von ATP, entsteht eine intra- und extrazelluläre Azidose, welche sich in einer Verminderung der Membranleitfähigkeit, negativer metabolischer Funktionen sowie in der verminderten Kalziumabhängigkeit der Myofilamente und einer gestörten Kalziumhomöostase zeigt. Durch den bereits angesprochenen Mangel an Nährstoffen kommt es zu einer Abnahme des Hauptenergieträgers der Zelle, ATP, und in Folge zu einem Abbau zu ADP (Abb. 1).

Resultat des ATP-Mangels, der Sauerstoffradikalbildung, dem Verlust der Ionenhomöostase und der Störung des intra- bzw- extrazellulären Ionengleichgewichts ist ein Ausfall der Na^+ -Pumpe und ein Wassereinstrom in die Zelle mit nachfolgender Ödembildung und Rupturbildung der Membran. Dadurch ist der irreversible Membranschaden zu definieren (AMRANI et al., 1999).

Die Bereitstellung von ATP-Vorgängermolekülen, aus denen die Zelle schnell wieder Energieträger aufbauen kann, ist somit eine weitere Aufgabe der Konservierungslösung (BELZER et al., 1988).

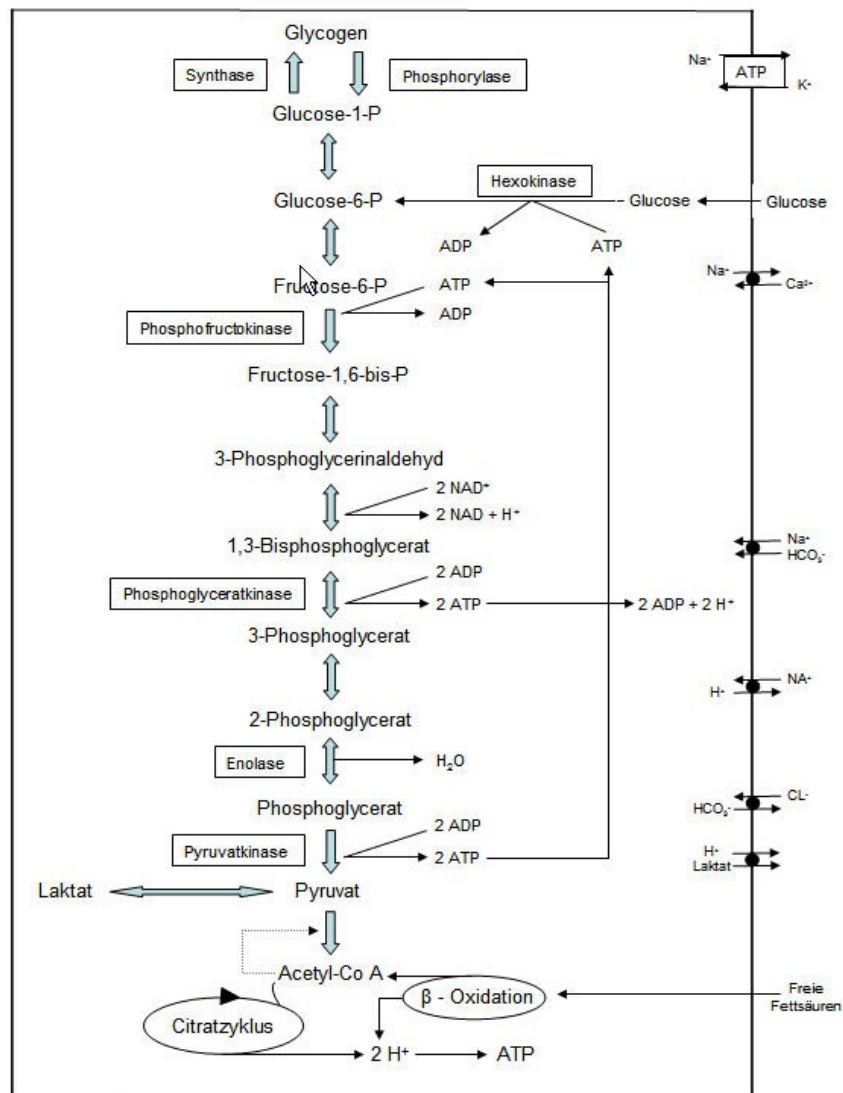


Abbildung 1: Glucosestoffwechsel der Myokardzelle, sowie wichtige Ionenkanäle

Besondere Beachtung hinsichtlich des Vorgangs der Ischämiephase gilt an dieser Stelle dem Myokard. Es ist durch endogene kardioprotektive Maßnahmen der Ischämie nicht hilflos ausgeliefert. Diese Tatsache beruht auf dem Mechanismus des myokardialen „Hibernation“. Im sogenannten „hibernating“ Myokard findet eine Reduktion der Funktion aufgrund der verminderten Durchblutung statt. Die Ursache der kontraktilen Dysfunktion ist noch ungeklärt. Nur wenige experimentelle Studien konnten bisher den zeitlich eng begrenzten Übergang der Ischämiephase bis zur kontraktilen Dysfunktion beobachten. Diskutiert werden eine veränderte Ansprechbarkeit der kontraktilen Elemente gegenüber Kalzium aufgrund einer Minimierung der Kraft der kontraktilen Elemente (HEUSCH et al. 1997).

Die angewendeten Konservierungslösungen unterscheiden sich in Entwicklung und Zusammensetzung. Die Konservierungslösungen sind unterschiedlich zusammengesetzt, je nach Einsatzgebiet. Die klinisch am meisten angewendete Konservierungslösung ist die „Euro-Collins-Lösung“. Diese Lösung wurde ursprünglich für die Konservierung der Niere entwickelt. Für diesen Verwendungszweck konnten bereits 1969 gute Ergebnisse für Ischämiezeiten bis 30 Stunden erzielt werden (COLLINS et al., 1969).

Ein großes Problem bei der Zusammensetzung der Lösung ist der hohe Kaliumgehalt. Primär sollte er eine Elektrolytverschiebung während der Ischämiezeit verhindern, führte aber sekundär zu einer Vasokonstriktion, die eine definitive homogene Verteilung der Lösung im Organpaket verhindert (KIMBLAD et al., 1991).

1.4 Kälteschädigung

Um das Problem der Gewebeschädigung zu minimieren, wurden im Laufe der Zeit verschieden Konservierungsverfahren entwickelt. Den Beginn dieser Entwicklungsphase stellt das Verfahren des „Topical Cooling“ dar. Hierbei wird das Organ in einem Eisbad gekühlt. Mit dieser Methode konnten bereits Ischämiezeiten bis zu 6 Stunden erreicht werden (JAMIESON et al., 1988).

Eine sich nicht durchgesetzte Konservierungsmethode wurde 1987 von HARDESTY propagiert: der normotherme autoperfundierte Herz-Lungen-Block. Diese äußert schwierig durchzuführende Methode wurde klinisch nicht weiter verfolgt, da sie zu keinen nennenswerten Verbesserungen in der positiven Weiterentwicklung der Konservierungstechnik führte (HARDESTY et al., 1987).

Ein weiteres Konservierungsverfahren ist das „Donor Cooling“. Das Prinzip besteht in der Senkung der Körpertemperatur des Spenders auf 8-10 °C mittels Kardiopulmonalem-Bypasses. Die Anwendung dieses Verfahrens beschränkt sich weltweit auf ein Zentrum (YACOUB et al., 1989).

Häufigere Anwendung findet die sogenannte „Single-Flush-Perfusion. Hier findet eine Perfusion des Spenderorgans mit Konservierungslösungen über die Pulmonalarterie statt.

1.4.1 Problematik der kaltischämisch vorbehandelten isolierten Myokardzellen

Organe, welche zur Transplantation entnommen werden, müssen gekühlt gelagert und transportiert werden, um bei komplett fehlender Organdurchblutung den durch Sauerstoffmangel ausgelösten Schaden möglichst klein zu halten. In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte an isolierten Leberendothelzellen jedoch gezeigt werden, dass diese Zellen bei einer Kälteischämieeinwirkung eine Schädigung durch redoxaktives Eisen und reaktive Sauerstoffspezies, und nicht aufgrund von Sauerstoffmangel (RAUEN et al., 1997), erleiden.

Aus diesem Grund ist eine weitere aufklärende wissenschaftliche Ermittlung des Vorgangs der Kälteischämie in Bezug auf eine Übertragbarkeit anderer Zellen interessant.

Diese Studie untersuchte Ursachen und Methoden zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Schädigung durch Kälteischämie mittels verschiedener Konservierungsmethoden bzw. –mittel.

1.4.2 Die Bedeutung der Sauerstoffradikale

Unter der Vielzahl von existierenden Sauerstoffradikalen ist das Hydroxyl-Radikal eines der aggressivsten und bedeutensten Sauerstoffradikale. Die Aggressivität der Sauerstoffradikale beruht auf der Tatsache, dass sich in der äußersten Schale des Orbitalmodells, ungepaarte Elektronen befinden. Ungepaarte Elektronen zeichnen sich durch eine hohe Reaktionsfreudigkeit aus. Dies bedeutet auf das Orbitalmodell bezogen, dass die äußerste Schale auf ein Maximum mit Elektronen besetzt werden muss. Dies kann nur durch eine chemische Reaktion mit einem anderen Molekül erreicht werden. Die Entstehung des Radikals beruht auf der Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion durch Metallkatalysierung.

Schließlich tragen diese Zellen noch zu dem Mechanismus bei, der für einen Grossteil des Reperfusionsschadens verantwortlich gemacht wird, der Freisetzung freier Sauerstoffradikale (EPPINGER et al., 1995, NOVICK et al., 1992).

Die Aufgabe der Antioxidantien ist es, den durch oxidativen Stress hervorgerufenen Schaden zu verhindern oder zu beseitigen. Dieser körpereigene Schutzmechanismus kann über verschiedene Bahnen gesteuert oder hervorgerufen werden: intrazellulär, extrazellulär, enzymatisch oder nicht enzymatisch. Als bekanntester Vertreter der nicht enzymatisch wirkenden Substanzgruppe ist an dieser Stelle das Ascorbat (Vitamin C) zu nennen. Es wirkt als Co-Faktor für α -Tocopherol (Vitamin E).

Ein wichtiger, auch in der vorliegenden Studie verwendeter bzw. vorkommender Antioxidant,

ist Trolox. Eine synthetische, wasserlösliche Form des natürlich lipophil vorkommenden antioxidativ wirkenden Vitamin E.

Bei der Zusammenstellung der ursprünglich für die Konservierung des Herzens entwickelten Celsior-Lösung wurde schließlich reduziertes Glutathion als Hauptradikalfänger eingesetzt. Grund dafür war unter anderem die Tatsache, dass Glutathion auf drei verschiedenen Wegen der Schädigung des Organs durch freie Radikale vorbeugt. So ist es ein Ko-Faktor von Peroxidase, einem Enzym, das Hydrogenperoxid inaktiviert. Es hält des weiteren Sulfhydrylgruppen von 18 Enzymen im reduzierten Zustand und erhält so deren Aktivität. Außerdem ist Glutathion selbst in der Lage, Sauerstoffradikale zu inaktivieren (MENASCHE et al., 1991).

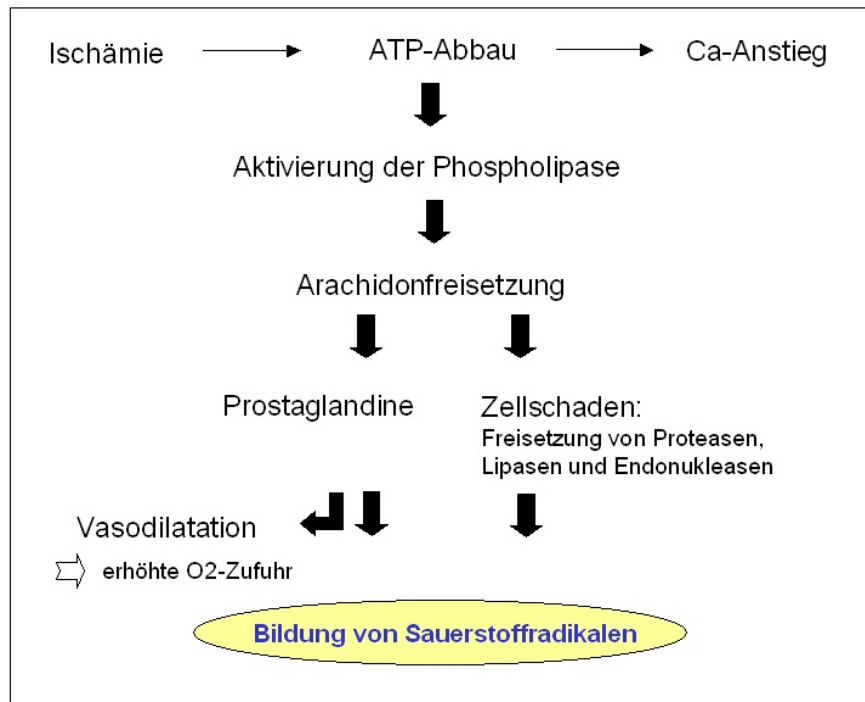


Abbildung 2: Bildung von Sauerstoffradikalen

1.4.3 Trolox als Konservierungslösung

Bei der Substanz Trolox handelt es sich um ein Derivat des α -Tocopherols (Vitamin E), eine synthetische, wasserlösliche Form des natürlich lipophil vorkommenden, antioxidativ wirkenden Vitamin E.

Trolox ist ein nicht enzymatisches Antioxidans. Tocopherol, ein Lipidphaseantioxidans, entfaltet seine Wirkung an der Zellmembran und inhibiert die Bildung von Lipidradikalen. Das bereits erwähnte Vitamin C dient als Co-Faktor in den beschriebenen Verbindungen.

Die Lipidperoxidationskette wird durch die Wirkung von α -Tocopherol unterbunden. Aufgrund dessen werden die Peroxylradikale in Lipidperoxyde umgewandelt. Das dadurch entstehende Tocopherol-Radikal wird durch Einfluss des Ascorbats zum Tocopherol reoxidiert.

Alle Formen von Vitamin E bestehen aus einem aromatischen Ringsystem, das als Antioxidans wirkt, und einer aliphatischen Strukturkomponente, durch welche die Struktur in der Lage ist, sich in den Phospholipid- und Lipoproteinmembranen der jeweiligen Zelle zu verankern.

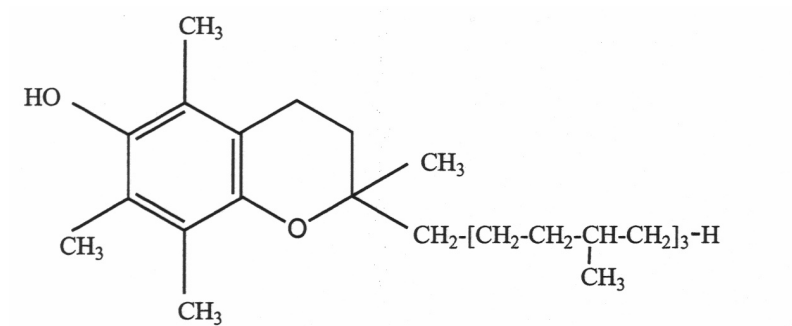


Abbildung 3: α -Tocopherol

Darstellung der chemischen Strukturformel von α -Tocopherol

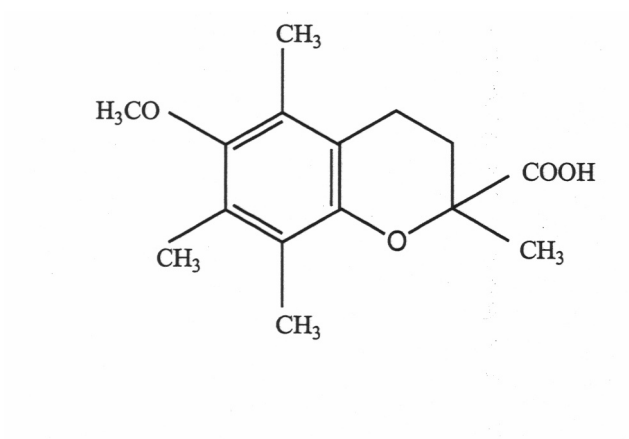


Abbildung 4: Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure)

Darstellung der chemischen Strukturformel von Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure)

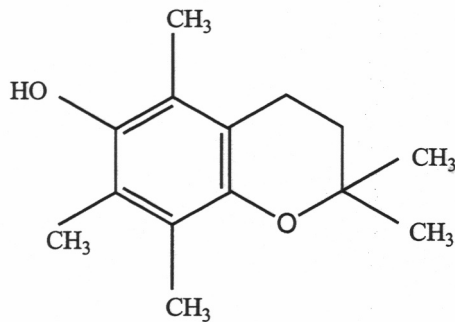


Abbildung 5: 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol

Darstellung der chemischen Strukturformel von 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol

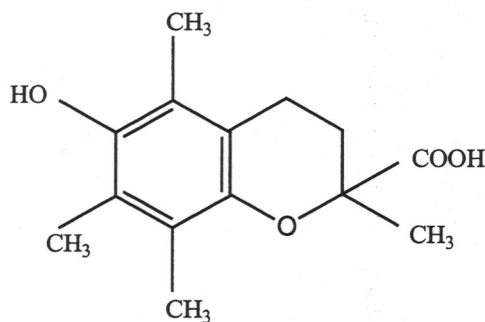


Abbildung 6: (R)-Trolox-methylether

Darstellung der chemischen Strukturformel von (R)-Trolox-methylether

1.4.4 Radikalfänger

Um der Schädigung der Zelle durch diese freien Radikale entgegenzuwirken, wurden bereits eine ganze Reihe von Substanzen geprüft, welche diese unschädlich machen sollten. Dabei handelte es sich um sogenannte Radikalfänger, enzymatische Hemmer der Produktion von freien Radikalen und Antioxidantien (GRACE, 1994).

Wie bereits erwähnt, ist Hypothermie in verschiedenen Zelltypen in der Lage, eine kälteinduzierte Apoptose über reaktive Sauerstoffmoleküle auszulösen (RAUEN et al, 1997).

Kälte verursacht demnach eine Erhöhung des zellulären, chelatisierbaren Eisenpools. Folge dessen ist eine schnelle Erhöhung von Sauerstoffradikalen. Diese verursachen die sogenannte kälteinduzierte Apoptose. Dem Auftreten dieser kälteinduzierten Apoptose wird versucht, durch intrazellulär wirkende Eisenchelatoren und Antioxidantien vollständig zu verhindern (DE GROOT et al. 1996).

Verschiedene Modifikationen von Radikalfängern wurden bereits verwendet. Der auch in vorliegender Studie verwendete Sauerstoffradikalfänger Trolox ist ein zellpermeables, wasserlösliches α -Tocopherol- bzw. Vitamin E-Derivat. Es entfaltet seine Wirkung durch eine Unterbrechung der Lipidperoxidationskette. Für die Versuche wurde es in Wasser gelöst und in einer Konzentration von 1mMol/L eingesetzt.

1.5 Experimentelles Modell

Kardioprotektionslösungen stehen weiterhin im Mittelpunkt klinischer Studien und Experimente. Ziel ist es, die Ischämiezeit zu verlängern und den Reperfusionsschaden zu mindern.

Folgende Grundprinzipien der Organprotektion wurden bereits 1988 beschrieben (BELZER et al., 1988):

- 1) Vermeidung der zellulären Azidose und damit Minimierung der Zellschwellung (Ödembildung) durch Hypothermie
- 2) Verhinderung eines Reperfusionsschadens durch redoxaktive Sauerstoffradikale während der Phase der Reperfusion

Eine optimale Konservierungslösung hat sich selbst im Laufe langer klinischer Studien nicht behauptet. Dies beweist allein die Tatsache, dass europaweit nicht zwei Transplantationszentren dieselbe Konservierungslösung anwenden (KIRK et al., 1993).

Mit der Anwendung der „Single-Flush-Perfusion“ hat sich zwar eine Konservierungsmethodik weitgehend durchgesetzt, nicht aber eine optimale Konservierungslösung. Im Laufe klinischer Studien wurden Konservierungslösungen gesucht, die in der Lage sind, eine Organschädigung zu verringern und die Ischämiezeit zu verlängern. Um dieses Ziel zu realisieren, wurden zunächst Lösungen vom extrazellulär wirkenden Typ von dem intrazellulär wirkenden Typ unterschieden. Ebenso wurden verschiedene Perfusionslösungen getestet. Zusätze wie Vasokonstriktoren, Radikalfänger oder impermeable Substanzen rückten in den Mittelpunkt der Interessen klinischer Studien.

Entwickelt wurden im Laufe der Zeit verschiedene Lösungen. So zum Beispiel die Euro-Collins-Lösung (EC-Lösung) in verschiedenen Variationen, die University of Wisconsin-Lösung (UW-Lösung), die Low Potassium Dextran Lösung (LPD-Lösung). Gemeinsame chemische Basis dieser Lösungen ist die kristalline Zusammensetzung und eine Infusionstemperatur von 4°C. Unter der kristallinen Gruppe der Konservierungslösungen kann unterschieden werden zwischen einer intrazellulären und einer extrazellulären Lösung. Die intrazelluläre Lösung ähnelt bezüglich ihrer Natrium- und Kaliumkonzentration einer intrazellulären Zusammensetzung (EC-Lösung und UW-Lösung).

Die heute am weitesten verbreitete Lösung ist die Euro-Collins-Lösung, entwickelt 1979. Ursprünglich wurde diese für die Nierentransplantation entwickelt mit relativ gutem Erfolg – Ischämiezeiten bis zu 30 Stunden konnten erzielt werden (STEFFEN et al., 1990). Eine Übertragung der Ischämiezeiten auf die Herztransplantation war leider nicht erfolgreich, hier wurden lediglich Ischämiezeiten bis zu maximal 6,5 Stunden erreicht (STEFFEN et al., 1990).

Folgende klinische Studien am Rattenmodell über die Brauchbarkeit der Euro-Collins-Lösung zur Konservierung von Herzen über einen Zeitraum von 24 Stunden offenbarten jedoch ein anderes Ergebnis. Es zeigte sich, dass die Euro-Collins-Lösung nur nach Hinzufügen einer geringen Menge Calcium eine durchaus sichere Kardioprotektion sichert. Die bei Ratten erhobenen Befunde ließen sich auf das Hausschwein übertragen. Die erzielten Ischämiezeiten konnten auf 24 Stunden erhöht werden (STEFFEN et al., 1990).

Einige Transplantationszentren setzten die Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) klinisch zur Kaltlagerung ein. Die HTK-Lösung befand sich seit 1960 in der Entwicklungsphase. Nachdem die Aminosäure Histidin als Puffer entdeckt wurde,

konnte HKT-Lösung als kardioprotektive Lösung erstmals bei einer Operation am offenen Herzen eingesetzt werden. In den folgenden Jahren wurde die Kardioplegielösung ebenso erfolgreich bei Nierentransplantationen eingesetzt (BRETSCHEIDER et al., 1992). Die Grundlage dieser Konservierungslösung stellt der niedrige Elektrolytgehalt dar, der durch eine hohe Konzentration der Histidin/Histidin-HCL-Puffers Isoosmolalität ermöglicht. Der zusätzliche Inhaltsstoff Tryptophan soll einen unkontrollierten Einstrom von Histidin in die Myokardzellen verhindern. Ketoglutarat dient als Metabolit des aeroben Stoffwechsels. Experimentelle Studien zeigten, dass Ischämiezeiten bis zu 24 Stunden möglich sind (LAMESCH et al., 1990).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Mechanismus der myokardialen Kältezellschädigung zu identifizieren und Strategien zu entwickeln, die dem entgegenwirken.

Die Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Vereinfachung und Standardisierung der Herzkonservierung zu Transplantationszwecken liefern. Es sollten Vergleiche möglich sein mit bereits etablierten herkömmlichen Kaltlagerungen. Es wurden Untersuchungen mit unterschiedlich chemisch zusammengesetzten Konservierungslösungen durchgeführt, um den Vorgang der Kälteschädigung bei Myokardzellen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Des weiteren war ein zusätzliches interessantes Ziel der vorliegenden Studie ein Vergleich mit bereits existierenden Studien der kälteinduzierten Ischämie auf zellulärer Ebene an Leber und Niere. Weiterhin sollte mit der vorliegenden Studie geklärt werden, ob Radikalfänger oder Eisenchelatoren protektiv wirken. Die durchgeführten Untersuchungen wurden an isolierten Herzmuskelzellen durchgeführt.

Der Konservierungsschaden wurde zu definierten Messzeitpunkten mittels lichtmikroskopischer und laborchemischer Parameter quantifiziert.

2 Material

2.1 Allgemeine Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Boehringer, Mannheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
BAPTA / AM	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Taufkirchen
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Dextran	Sigma, Taufkirchen
DTE	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
KCN	Sigma, Taufkirchen
Medium 199	Biochrom, Berlin
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

2.2 Spezielle Chemikalien

Apoptose-Assay	
HOE 33258	Calbiochem, Bad Soden
Isoprenalin	Sigma
Trolox	Fluka
HTK	Fr. Dr. Rauen, Uni Essen

N30	Fr. Dr. Rauen, Uni Essen
Desferal	Fr. Dr. Rauen, Uni Essen
LK 616	Fr. Dr. Rauen, Uni Essen
LK 614	Fr. Dr. Rauen, Uni Essen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Calbiochem (Bad Soden), Bibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 Zellkulturmedien

- **CCT-Kulturmedium**

Medium 199 Hepes gepuffert	x nl
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin- β -Arabinofuranosid	100 Mol/l

- **Powell-Medium**

NaCl	110 mMol/l
NaHCO ₃	25 mMol/l
KCL	2,6 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
Glucose	11 mMol/l
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2 mMol/l

- **Vorinkubationsmedium**

Medium 199 HEPES gepuffert	x ml
FCS	4% (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 g/ml

- **Ausplattiermedium**

Medium 199 HEPES gepuffert	100 ml
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Penicillin	100 IU / ml
Streptomycin	100 g/ml

2.3.2 Puffer und Lösungen für die Zellpräparation

- **Collagenase-Puffer**

Powell-Medium	50 ml
Collagenase	20 mg
Calcium-Stammlösung	12,5 l

- **M199/HEPES**

Medium 199 Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mMol/l
auf pH 7,4, titriert und sterifiltriert	

- **Gradienten-Lösung**

Powell-Medium	x ml
Albumin	4% (wt/vol)
CaCl ₂	1 mMol/l

- **Calcium-Stammlösung**

CaCl ₂	100 mMol/l
-------------------	------------

2.3.3 Zusammensetzung der Konservierungslösungen

- **Trolox**

(R)-Trolox-Methylether

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxyl-Säure

12,5 mg Trolox werden mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Konzentration an Trolox betrug 1 mMol/l.

- **HTK-Lösung**

0,8766 g Natriumchlorid, 15,0 mMol/l

0,6710 g Kaliumchlorid, 9,0 mMol/l

0,8132 g Magnesiumchlorid x 6H₂O, 4,0 mMol/l

3,7733 g Histidinhydrochlorid-Monohydrat 18,0 mMol/l

27,9289 g Histidin, 180,0 mMol/l

0,4085 g Tryptophan, 2,0 mMol/l

5,4651 g Mannitol, 30,0 mmol/l

0,0022 g Calciumchlorid x 2 H₂O, 0,015 mMol/l

0,1842 g Kalium-hydrogen-2-oxopentandioat, 1,0 mMol/l

- **Na30** (pH = 7,0; Osmolarität = 305,06)

Cl⁻, 0,04 mMol/l

α-Ketoglutarat 3 mMol/l

Aspartat 10 mMol/l

N-Acetylhistidin (-) 26 mMol/l

Lactobionat 11 mMol/l

Na⁺ 16 mMol/l

K⁺ 10 mMol/l

Mg²⁺ 8 mMol/l

Ca²⁺ 0,02 mMol/l

Arginin 2 mMol/l

Histidin 9 mMol/l

N-Acetylhistidin 38 mMol/l

Glycin 20 mMol/l
Alanin 10 mMol/l
Tryptophan 2 mMol/l
Saccharose 83 mMol/l
Histidin 57 mMol/l

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau des Physiologischen Institutes
Gewebehacker	Harvard Scientific, Holliston, MA, USA
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop TMS-F	TMS-F von Nikon, Japan
50 ml Röhrchen (Falcon 2070)	Becton Dickinson, Heidelberg
Primaria Falcon (Typ 3803)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Zellkontraktion

Interface INT 4	Scientific Instrumenhts GmbH, Heidelberg
Lichtmikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Japan
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Japan
Stimulator	Physiologisches Labor der Justus-Liebig-Universität Giessen

2.4.3 Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen

Glasrührer	Schott, Mainz
Küvetten	Bio-Rad, München
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterifilter (0,2µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser	Sigma, Taufkirchen
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2.4.5 Software

Excel	Microsoft
Mucel	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Image-Quant	Molekular Dynamica, Krefeld
SPSS	SAS Software-Version 6.11

3 Methoden

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Herzmuskelzellen wurden aus den adulten männlichen Wistar-Ratten (Lebendgewicht 250-350 g) isoliert. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Nahrung (Standard-Futter Altromin) und Wasser.

3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte entsprechend der zuvor publizierten Methode (SCHLÜTER et al., 2005).

Nach kurzer Diethyläthernarkose (ca. ein bis zwei Minuten) wurde der Thorax der Versuchstiere mittels Schnitt entlang des unteren Rippenbogens und zweier parasternaler Schnitte eröffnet, das Mediastinum dargestellt und das Perikard abpräpariert. Anschließend wurden sowohl Lunge als auch Herz mit einer Schere abgetrennt und in eine bereitstehende Petrischale mit kalter (+4°C) physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dort wurde das dem Herzen noch anhängende Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt und die Aorta weiter freipräpariert. Das Herz wurde danach mit der Aorta an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und retrograd perfundiert. Das in dem Herzen verbliebene Blut wurde zunächst mit 40 ml Powell-Medium für 25 Minuten mit einer Flussrate von etwa 2-3 ml/min pro Herz ausgewaschen. Vor und während der Perfusion wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt. Das Ventrikelgewebe wurde mittels eines Gewebehackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde es unter Carbogenbegasung für 10 Minuten in Perfusionspuffer mit 1% Albumin bei 37°C inkubiert. In dieser Lösung wurde die Isolierung der Myokardzellen durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer Pipette unterstützt.

Im Anschluss wurde die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) filtriert, um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Die filtrierte Zellsuspension wurde anschließend bei 29 g für 3 min zentrifugiert, um die Collagenase-Lösung, Zelltrümmer und kleinere Zellen (wie z.B. Endothelzellen) von den intakten Zellen abzutrennen. Das hierbei entstandene Pellet wurde mit Powell-Medium, welches 200 mMol/l CaCl_2 enthielt, aufgenommen und nochmals bei 25 g für zwei Minuten zentrifugiert. Das hierbei sedimentierte Pellet wurde in Powell-Medium plus 400 mMol/l CaCl_2 aufgenommen und zu einer homogenen Zellsuspension aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule der Gardienten-Lösung beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (60 Sekunden, bei 25 g) wurde eine Zellpopulation gewonnen, die zu 70-80% aus stäbchenförmigen, ventrikulären Kardiomyozyten bestand.

3.1.3 Zellkultur

Um die Anheftung der Kardiomyozyten, auf den im späteren Versuchsaufbau verwendeten Kulturschalen, zu gewährleisten, wurden die Kulturschalen bereits am Vortag der Präparation zusammen mit Vorplattiermedium mit 1ml/Schale über Nacht inkubiert. Dieses Medium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der präparierten Kardiomyozyten aus den Kulturschalen abgesaugt.

Das Zellpellet mit den isolierten Kardiomyozyten wurde vorsichtig mit 25 ml CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer resultierenden Plattierungsdichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 wieder ausplattiert.

Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit Ausplattiermedium gewaschen. Dabei wurden die abgerundeten und nicht haftenden Zellen entfernt und die verbleibende Kultur enthielt zu ca. 90% intakte stäbchenförmige Kardiomyozyten (vgl. Abb. 8). Anschließend wurden die Kardiomyozyten mit Kontrollmedium bzw. Testmedien inkubiert.

3.1.4 Myozytenlagerung

Die frisch inkubierten Myokardzellen wurden in Kulturschälchen bei 4°C für 12 Stunden gelagert.

3.2 Versuchsgruppen

3.2.1 HTK als Konservierungslösung

Grundlage dieser Versuchsgruppe ist die zur Kardioplegie und vor allem zur Organkonservierung des Herzens und der Niere verwendete HTK-Bretschneider Lösung (Custodiol, Fa. Dr. F. Köhler Chemie). Ihre einzelnen Bestandteile (in mMol/l) sind folgende:

Zusammensetzung der Bretschneiderschen Lösung:

NaCl	15
KCl	9
Kaliumhydrogen-2	1
ketoglutarat	4
MgCl x 6 H ₂ O	18 l
Histidin x HCl H ₂ O	180
Histidin	2
Tryptophan	30
Mannitol	0,015 l
CaCl	50
Anion: Chlorid	
in 1000 ml Aqua ad injectabile, pH 7,02-7,2, Osmolalität 310 mOsmol/kg	

Tabelle 1: Zusammensetzung der HTK-Bretschneider Lösung

3.3 Optische Instrumente zur Zellauszählung – Lichtmikroskopie

Prüfung der optischen Vitalität der Myokardzellen

3.3.1 Probenvorbereitung

Nach einer Wärmeinkubation bei 37°C und direktem Aufbringen der Inkubations- und Testmedien erfolgte eine erste Auszählung der Myokardzellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Dabei wurden die intakten stäbchenförmigen Zellen (vitale Myokardzellen, Abb. 8) von den hyperkontrahierten geschädigten (Abb. 7) optisch unterschieden und anschließend ausgezählt.

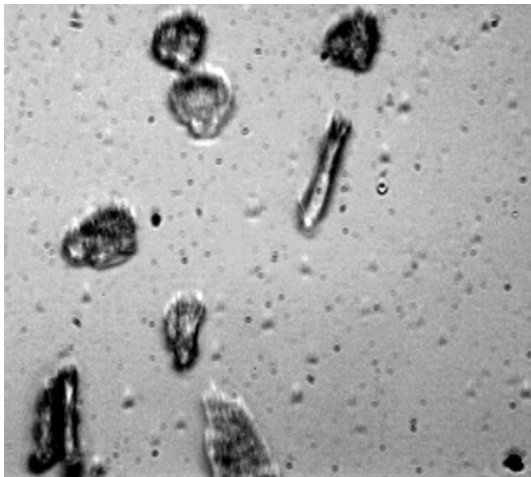


Abbildung 7: Nekrotische Zellkörper

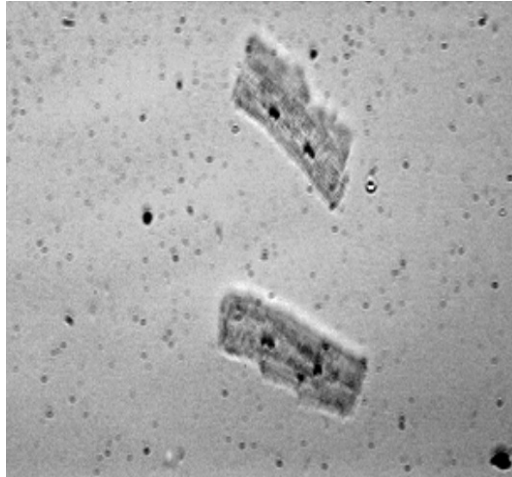


Abbildung 8: Vitale Zellkörper

Anschließend wurden die Zellkulturschalen für 24 Stunden bei 4°C gelagert und es erfolgte ein zweites Auszählen zur Kontrolle. Auch hier fand wieder eine optische Unterscheidung zwischen stäbchenförmigen und runden Zellkörpern statt.

3.3.2 Gruppeneinteilung

Versuchs- gruppe	Anzahl der Zellkulturschalen	Dauer der Kälteeinwirkzeit [h] [4°C]	Dauer der Wärmeeinwirkzeit [37°C] [h]	Konservierungs- methode
I	8	24	0	LK 614
II	8	24	0	LK 616
III	6	24	0	Desferal

IV	4	24	0	Trolox
V	2	0	24	CCT (Kontrolle)

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der verschiedenen Konservierungslösungen

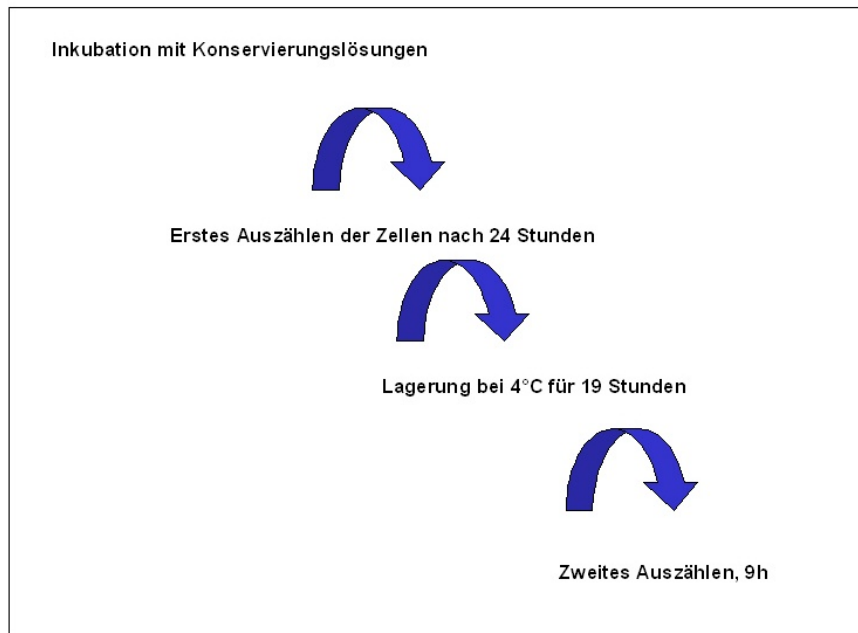


Abbildung 9: Übersicht: zeitlicher Ablauf der Auszählung

3.4 System der Lichtmikroskopie

Das Lichtmikroskop ist ein optisches Instrument, das ein Objekt durch optische Abbildung mit Linsen vergrößert. Es eignet sich daher zur Darstellung von Gewebestrukturen, Zellen, Organellen etc..

Das vom Objekt kommende Licht wird durch eine Kombination von mindestens 2 Linsensystemen, dem Objektiv und dem Okular optisch abgebildet. Dabei bildet zunächst das Objektiv ein reales Zwischenbild ab, welches durch das Okular analog zur Lupe vergrößert betrachtet wird. Die Objektive sind austauschbar, so dass die Vergrößerung der jeweiligen Aufgabenstellung, bzw. Vergrößerung angepasst werden kann. Der Objektivrevo­lver ermöglicht den schnellen Objektivwechsel durch Drehen des jeweils gewünschten Objektivs in den Strahlengang. Eine große Auswahl von Objektiven steht zur Verfügung, die sowohl hinsichtlich der Vergrößerung, der Transmissionseigenschaften, der chromatischen/sphärischen Korrektur sowie des

Arbeitsabstandes für die jeweilige Anwendung optimiert sind. Als Strahlenquelle werden oft Halogenlampen verwendet. Das Licht der Strahlenquelle wird durch Kondensorlinsen auf das Objekt fokussiert. Durch eine Irisblende unter dem Kondensator wird die Beleuchtungsapertur kontrolliert. Die Kondensorlinsensysteme sind für chromatische und sphärische Aberration korrigiert.

Im vorliegenden Versuchsexperiment wurde das Prinzip der Durchlichtmikroskopie angewendet, bei der das Objekt sehr dünn ist und von der dem Objektiv abgewandten Seite beleuchtet wird

Die Wellenlänge des Lichts beschränkt nach den Gesetzen der Optik die Auflösung des Lichtmikroskops auf etwa 0,3 Mikrometer. Zur Erhöhung der Auflösung kann entweder UV-Licht verwendet, oder zwischen Objekt und Objektiv Öl gegeben (Ölimmersionsmikroskop) werden, wodurch das Mikroskop auch lichtstärker wird.

3.5 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.5.1 Probenvorbereitung

Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld wurde mit Übernachtskulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet.

Gruppeneinteilung

Versuchsgruppe	Anzahl der Zellkulturschalen	Dauer der Kälteeinwirkzeit [h] [4°C]	Dauer der Wiedererwärmung [h] / Wärmeeinwirkzeit [37°C]	Konservierungsmethode
I (n=6)	2	0	18 (24)	CCT = Kontrollmedium
II (n=6)	2	12 (20)	6 (4)	HTK
III (n=6)	2	12 (20)	6 (4)	N30

Tabelle 3: Einteilung der Versuchsgruppen

Nach einer Inkubationszeit in Kälte über 20 Stunden mit verschiedenen Konservierungsmethoden (siehe Kapitel Ergebnisse) wurden die Zellkulturschalen aus dem 4°C kalten Kühlschrank genommen, das jeweilige Konservierungsmittel wurde abgesaugt und durch CCT ersetzt. Die jeweiligen Kontrollmedien wurden nicht verändert. Nach einer Wiedererwärmungszeit von 4 Stunden wurden die Kontraktionsparameter der Myozyten jeweils mit und ohne Zugabe von Isoprenalin zur Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren gemessen.

3.5.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Die mit CCT-gefüllte Kulturschale wurde auf dem Objektisch eines Mikroskops befestigt und mit einem Spezialdeckel verschlossen. In diesem Deckel war über vier Löcher ein fortlaufender Draht befestigt, welcher über eines der zwei Löcher, der späteren Kathodenseite, eintaucht und dem benachbarten wieder herausführt, ebenso verhält es sich mit der späteren Anode, die durch eine Verbindung des Drahtes mit dem Elektrostimulator zustande kommt. Die Anoden- und Kathodendrahtlänge wurde so gewählt, dass dieser problemlos in die CCT-gefüllte Kulturschale eintauchen kann. Der Draht war so gebogen, dass er annähernd senkrecht in die gefüllte Schale eintauchte, dann abknickte und horizontal durch den Puffer verlief, daraufhin wieder abknickte und senkrecht die Flüssigkeit verließ. In der mit diesem Spezialdeckel verschlossenen Kulturschale befanden sich demnach zwei gegenüberliegende, horizontal verlaufende Drähte, welche beide in die CCT-gefüllte Schale eintauchten. Die beiden Drähte stellten, wie bereits erwähnt, Anode und Kathode dar. Nachdem diese an den elektrischen Stimulator angeschlossen wurden, baute sich zwischen ihnen ein elektrisches Feld auf, das aufgrund der vorliegenden Drahtform mit einem homogenen Feld zu vergleichen war und somit zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss zwischen den beiden Drähten führte.

Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur anschließenden Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang.

Es war möglich, den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorzugeben, indem man die Stimulationsfrequenz veränderte.

Diese Methode wurde bereits von SCHLÜTER et al. 2003 beschrieben.

3.5.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfasst. Während der Stimulation der Zellen in der Kulturschale befand sich diese auf dem Objekttisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war eine Beobachtung der kontrahierenden Zellen möglich.

An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Zeilenkamera. Mit ihrer Hilfe war es möglich, Zellgrenzen zu erfassen. Bei der anderen Kamera handelte es sich um eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor.

Um eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste diese so positioniert werden, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu war die jeweilige Kulturschale so zu bewegen, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, die Zeilenkamera wurde dann so gedreht, bis sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden. Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5 V/cm geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Verschieden starke y-Auslenkungen wurden auf dem Oszillographen dargestellt, wenn die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm. Diejenigen Amplituden, die die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden. Dadurch wurde es möglich, die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen zeitgleich zu beobachten. Dieser wurde als Zweikanaloszillograph betrieben. Auf dem zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert. Es wurde eine Triggermarke vor eine Amplitude des Zellbildes

gesetzt. Erreichte die ansteigende Spannung des jeweiligen Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), so konnte der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzeichnen. Diese Stelle konnte man am Bildschirm des Oszillographen, im zweiten Kanal, in Form eines Sprunges der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe erkennen.

Wurde die Amplitude des Zellbildes im Laufe der Kontraktion verändert, so veränderte sich auch die Position, an der der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sie ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild konnte man beobachten, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Es war damit möglich, die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen zu beobachten. An der anderen Zellkante wurde analog verfahren.

Die Information wurde vom Registriergerät mit einem Computer aufgezeichnet.

Auf diesem war das Programm MUCCELL der Firma Scientific Instruments GmbH installiert. Das Programm war in der Lage, aus der Information Spannung aus bzw. an Länge der Zelle zu einem definierten Zeitpunkt zu registrieren. Anhand der registrierten Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit darstellte. Dies ergab eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle zeigte. Anhand der jeweils einsetzenden Längenverkürzung erkannte der Computer den jeweiligen Beginn einer Kontraktion. Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte die folgenden Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (Time to peak) in Millisekunden
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde
6. Die Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden

7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

Der Quotient $\Delta L/L$: Man bilde die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge und dividiere diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. In Prozent ausgedrückt zeigt $\Delta L/L$ an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.

3.5.4 Messprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 0,5 Hz viermal gemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Die auf diese Weise erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden mit dem Programm Excel weiterverarbeitet: Aus diesen jeweiligen vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt.

3.6 Apoptose und Nekrose

3.6.1 Definition und Bedeutung

Morphologische Kriterien der sich vollziehenden Apoptose sind: Im Zellkern findet eine Chromatinkondensation statt, d.h. der Kern fragmentiert sich und es bilden sich Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran, die sich später als apoptotische Körperchen abschnüren (ELLIES et al., 1991). Die Zelle selbst schrumpft und löst sich von ihrem Untergrund ab.

Diesen zuvor beschriebenen morphologischen Veränderungen an der Zelle sind verschiedenartige biochemische Vorgänge zuzuordnen: diese reichen über eine Fragmentierung der nukleären DNA, über verschiedenartige Membranveränderungen bis schließlich hin zur Phagozytose. Um den Schritt der Phagozytose, durchgeführt von benachbarten Zellen, zu erleichtern, reduziert die apoptotische Zelle ihr Volumen, wie z.B. durch ein Verschieben des Ionenungleichgewichts.

Der apoptotische Zelltod lässt sich klar von dem durch Nekrose abgrenzen.

Im Gegensatz zum Zelltod durch Apoptose, bei dem sich eine ionenkonzentrationsbedingte Volumenminderung vollzieht, findet bei der Nekrose ein Anschwellen der Zelle durch Einströmen von Wasser und Elektrolyten statt. Dies führt zu einem Reißen der Plasmamembran und einem Austritt von Zellorganellen. Ein entzündlicher Prozess wird induziert und die nekrotische Zelle schließlich von Makrophagen phagozytiert. Grundsätzlich unterscheidet sich die Nekrose von der Apoptose durch ein Fehlen von apoptotischen Körperchen (MAJNO et al. 1995), eine Chromatinverdichtung fehlt ebenfalls. Fraglich ist bisher das Auftreten von DNA-Fragmenten. Diese treten sowohl bei dem apoptotischen Zelltod als auch bei einem nekrotischen Zelltod auf, wenn auch in nachgewiesener Unregelmäßigkeit, vielmehr handelt es sich hier um zufällige DNA-Brüche (GOLD et al. 1994).

Die physiologische Bedeutung der Apoptose liegt vor allem in der Beseitigung von geschädigten, infizierten oder transformierten Zellen im Organismus und in der Differenzierung von verschiedenen Geweben und Organen in der Wachstumsphase. Die Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen und auch der pathophysiologische Prozess der Apoptose, wie z.B. Zellentartung/Zellwucherung bei verschiedenen Krebsarten spielt ebenfalls eine wichtige Rolle (WYLLIE et al., 1980)

3.6.2 Apoptoseinduktion

Bei der Erklärung der Apoptoseinduktion sind bisher zwei Hauptsignalwege bekannt. Während der eine über eine Abhängigkeit der Aktivierung von verschiedenartigen Rezeptoren (ASHKENAZI et al. 1998) läuft, ist der andere durch unterschiedliche Faktoren, wie z.B. Mitochondrien (KROEMER et al. 1997), ausgelöst.

3.6.3 Parameter zur Messung der Apoptose

Quantitativer Apoptosenachweis mittels der Hoechst 33258/Propidiumiodid Doppelfärbung

Etwa 20 Stunden nach Apoptose-Induktion (vgl. 3.2.4.) wurden die Farbstoffe Hoechst 33258 (Hoe 33258) (5 g/ml) und Propidiumiodid (PI) (1 g/ml) nacheinander

in das Kulturmedium gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die Farbstoffe im Medium verteilt, anschließend die Kultur für weitere 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Hoe 33258 ist ein zellmembrangängiger DNA-Farbstoff, der alle Zellen bzw. deren Chromatin im Kern anfärbt. Dadurch kann die für die Spätphase der Apoptose typische Kondensation der Kerne, mit oder ohne Fragmentierung, besonders gut erkannt werden (Abb. 3.4.A). Hoe 33258 wird bei einer Wellenlänge von 340-360 nm angeregt und zeigt bei Anregung eine intensive blaue Fluoreszenz.

Propidiumiodid ist ein nicht zellmembrangängiger DNA-Farbstoff. Deshalb werden durch ihn nur Zellkerne nekrotischer Zellen, deren Zellmembranen bereits geschädigt sind, angefärbt. Propidiumiodid wird mit einem Spektrum von 510-550 nm angeregt und zeigt bei Anregung eine intensiv rote Fluoreszenz.

Im Durchlicht (Abb. 3.4.B) wurden pro Schale ca. 200 Zellen ausgezählt, die anschließend bei entsprechender Wellenlänge auf ihren Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen analysiert wurden.

Dies geschah bei einer Vergrößerung von 10x20 und zufällig gewählten Gesichtsfeldern.

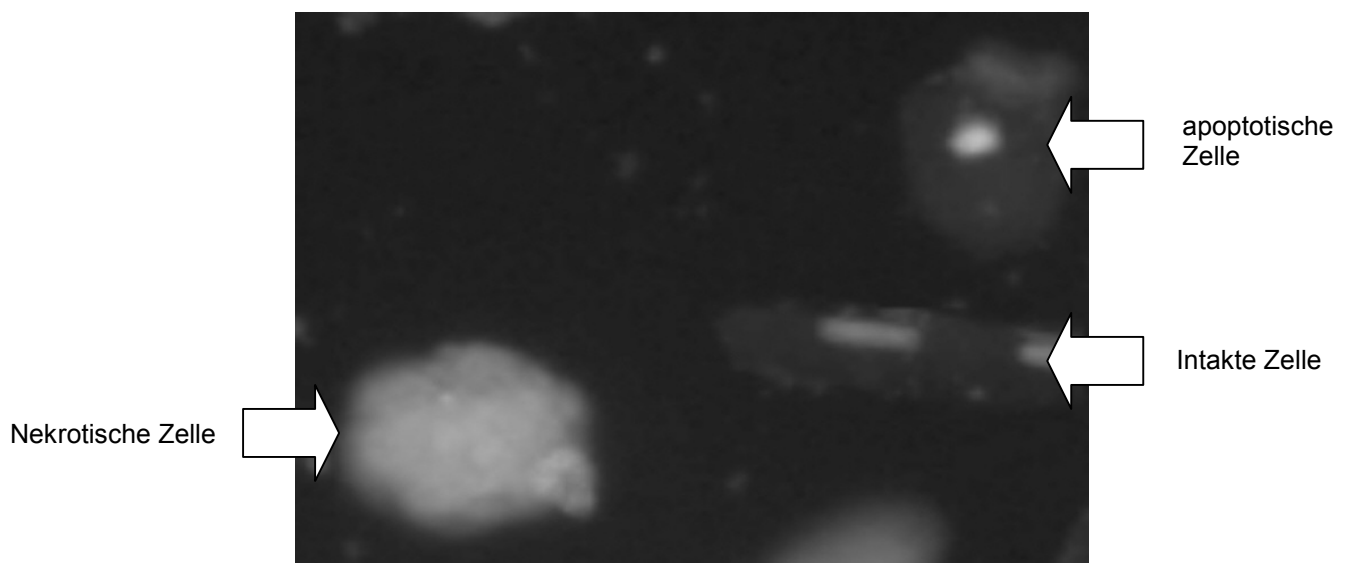


Abbildung 10: Zelldarstellung mittels Hoe-Färbung

Nachweis der Chromatinkondensation. Ausschnitt eines Gesichtsfeldes unter Fluoreszenzanregung (350 nm). Die Zellen wurden mit Hoe 33258 gefärbt. Zu sehen ist eine apoptotische Zelle mit rundem Zellkörper und rundem, fluoreszierendem Zellkern. Die intakte Zelle unterscheidet sich durch einen stäbchenförmigen Zellkörper.

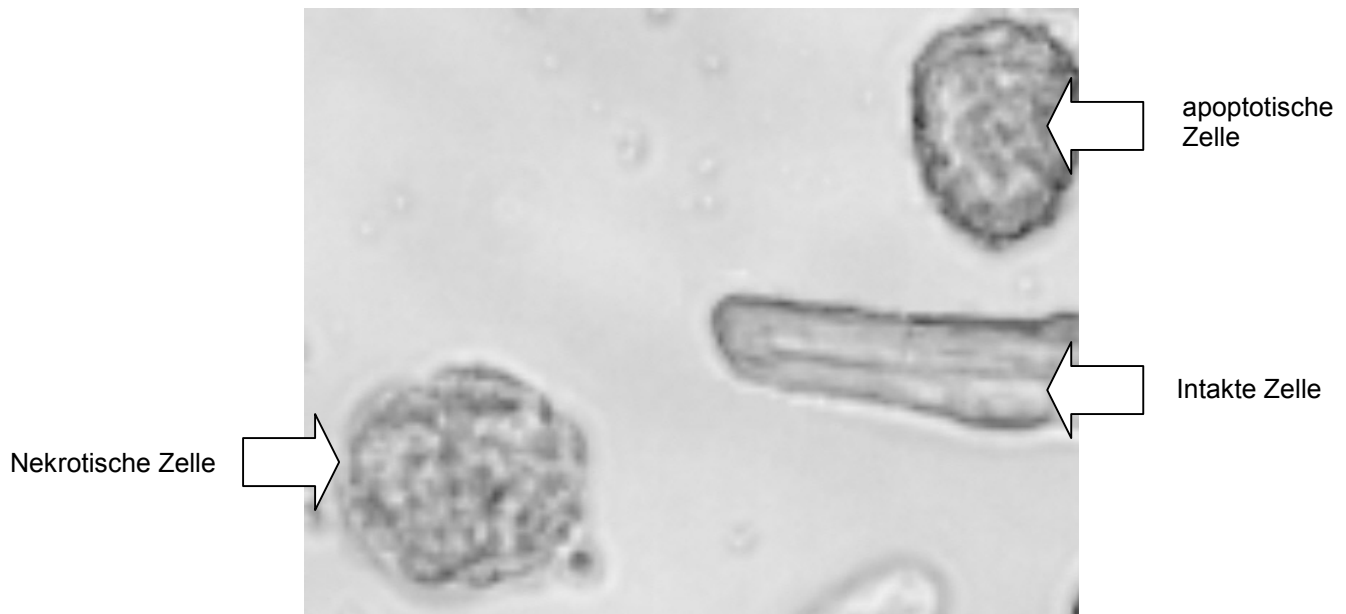


Abbildung 11: Zelldarstellung mittels Durchlicht

Ausschnitt eines Gesichtsfeldes im Durchlicht. Es wurde der gleiche Ausschnitt wie in Abb. 10 gewählt. Hier lässt sich die nekrotische Zelle nicht von der apoptotischen Zelle unterscheiden.

3.6.4 Datenerfassung

Zur Datenerfassung und Datenverarbeitung wurde Microsoft Excel 2000[®] sowie SPSS[®] Version 11.5.1. (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) verwendet.

3.6.5 Statistik

Aus den verschiedenen Präparationen wurden die Einzelkontraktionsmessungen zusammengefasst, der Mittelwert und der Standardfehler bestimmt. Zwei Gruppen wurden mit einem t -Test verglichen. Waren mehr als zwei Gruppen in einem Test zu vergleichen, ist zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt worden (ANOVA) und im

Anschluss daran ist ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet worden.

Daten mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung

Um den Einfluss verschiedener Konservierungslösungen, darunter Eisenchelatoren und Radikalfänger, unter einer 24-stündigen Kälteexposition gegenüber CCT als Kontrollmedium in Warminkubation zu untersuchen, wurden die isolierten Herzmuskelzellen der Ratte für 24 Stunden in CCT, LK 614, LK 616, Desferal und Trolox inkubiert.

Nach einer Wärmeinkubation bei 37°C und direktem Aufbringen der Inkubations- und Testmedien erfolgte eine erste Auszählung der Myokardzellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Dabei wurden die intakten stäbchenförmigen von den hyperkontrahierten, geschädigten Zellen optisch unterschieden und anschließend ausgezählt (Abb. 7 und 8).

Danach wurden die Zellkulturschalen für 19 Stunden erneut bei 37°C gelagert und es erfolgte ein zweites Auszählen zur Kontrolle. Auch hier fand wieder eine optische Unterscheidung zwischen stäbchenförmigen und runden Zellkörpern statt.

Die Herzmuskelzellen wiesen nach der Inkubation über Nacht unter Warminkubation mit dem Kontrollmedium CCT mit ca. 8% einen weitaus geringeren Prozentsatz an hyperkontrahierten Zellen auf als die über den selben zeitlichen Raum unter Kaltinkubation gelagerten Kulturen (Abb. 12).

Von den unter Kaltinkubation aufbewahrten Kulturen wiesen die mit Desferal inkubierten mit ca. 50% den höchsten prozentualen Anteil an hyperkontrahierten Zellen auf. Die Testmedien LK 614 und LK 616 wiesen ebenfalls keine signifikanten positiven prozentualen Anteil an intakten, stäbchenförmigen Zellen auf. Einzig positiv mit einem Anteil von ca. 10% an hyperkontrahierten Zellen fiel der Testzusatz Trolox auf (Abb.12).

Die quantitative vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen vor einer 24-stündiger Kaltinkubation mit LK 614, LK 616, Desferal und Trolox ist in

Abbildung 13 dargestellt. Es sind die prozentualen Anteile der vitalen bzw. stäbchenförmigen Ausgangszellen (ebenfalls die Kontrollzellen) bei Warminkubation graphisch dargestellt.

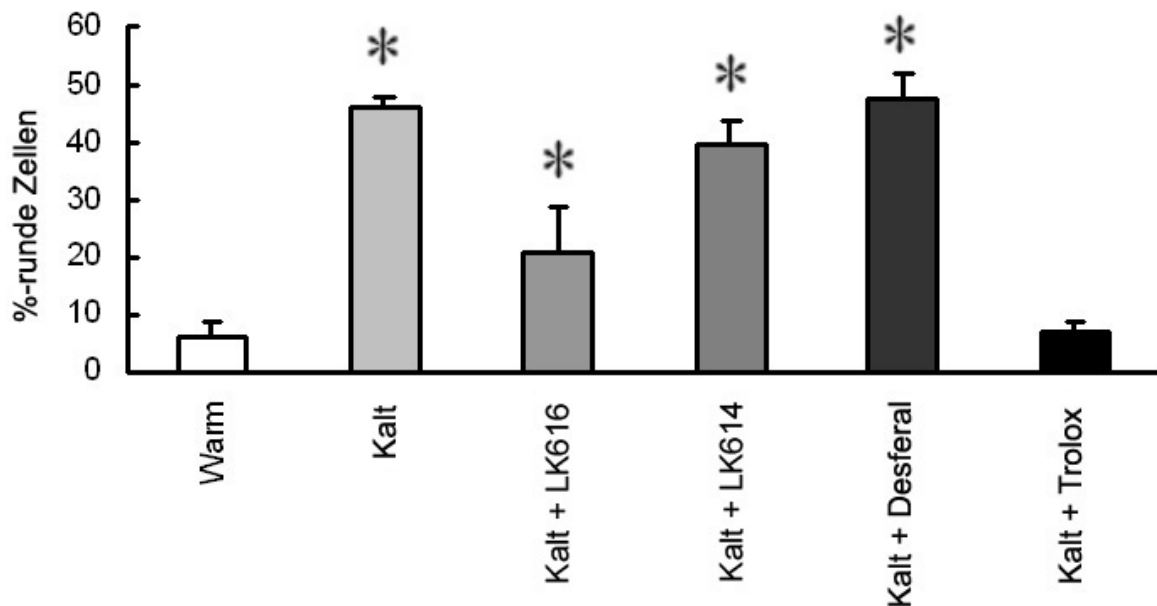


Abbildung 12: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium

Darstellung der 24-stündigen Kalt- bzw. Warminkubation in CCT (1 mMol/l), verglichen mit LK 614 (1 mMol/l), LK 616 (1 mMol/l), Desferal (1mMol/l) und Trolox (1 mMol/l) unter Kaltinkubation. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über Nacht in Kulturmedium CCT (1 mMol/l) und in den Testzusätzen (LK616, LK614, Desferal und Trolox) gelagert. Dargestellt sind die Anzahl der hyperkontrahierten (runden) Zellen zu Versuchsende, *p < 0,05 vs. Warminkubation, n= 4 Präparationen.

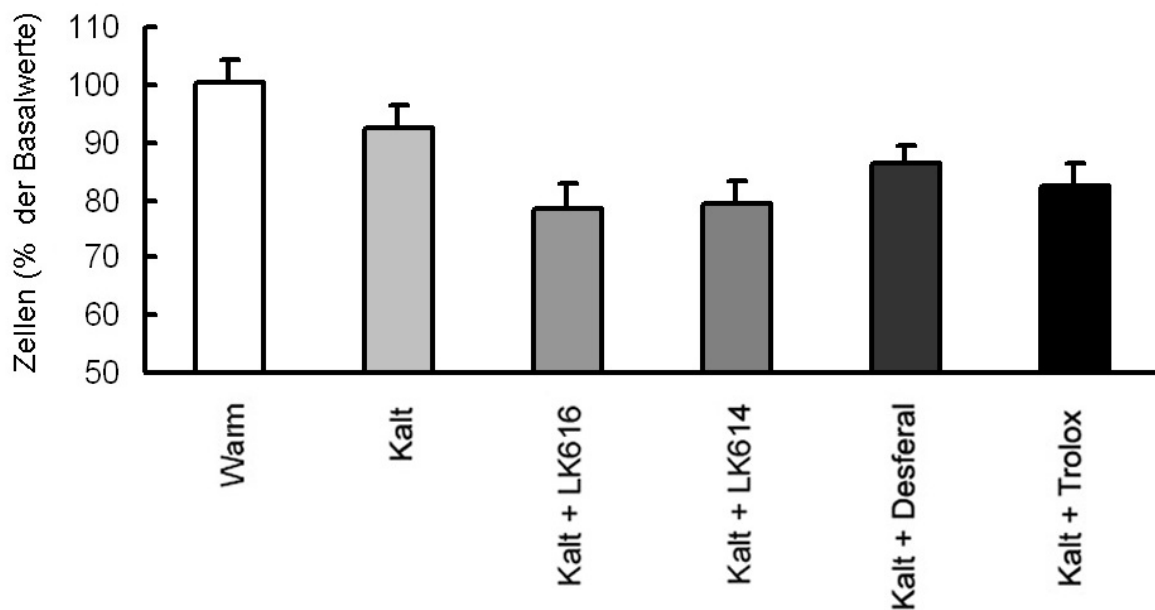


Abbildung 13: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium (Basalwerte)

Graphische Darstellung der Basalwerte unter Kaltinkubation. Verglichen wurden die Testzusätze LK 616, LK 614, Desferal und Trolox sowie das Kontrollmedium CCT (jeweils 1 mMol/l).

4.2 Einfluss von Trolox auf die kälteinduzierte Zellschädigung

Um den Einfluss einer 24-stündiger Kaltinkubation der Myokardzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT auf das Verhalten der Hyperkontraktion der Zellen zu untersuchen, wurden die isolierten Herzmuskelzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT über Nacht bei Kaltlagerung (4°C) inkubiert. Die lichtmikroskopische Auszählung erfolgte 24 Stunden später. Die Darstellung der lichtmikroskopisch ausgewerteten Myokardzellen kann aus Abbildung 14 entnommen werden. Zu sehen sind repräsentativ vergleichende lichtmikroskopische Auswertungen der mit Trolox bzw. dem Kontrollmedium CCT behandelten Myokardzellen. Es zeigt sich hierbei ein signifikanter Unterschied in der morphologischen Struktur der Herzmuskelzellen. Während die mit CCT behandelten Zellen überwiegend eine hyperkontraktierte, runde Struktur aufweisen, weisen die mit Trolox behandelten Zellen eine überwiegend stäbchenförmige Struktur auf.

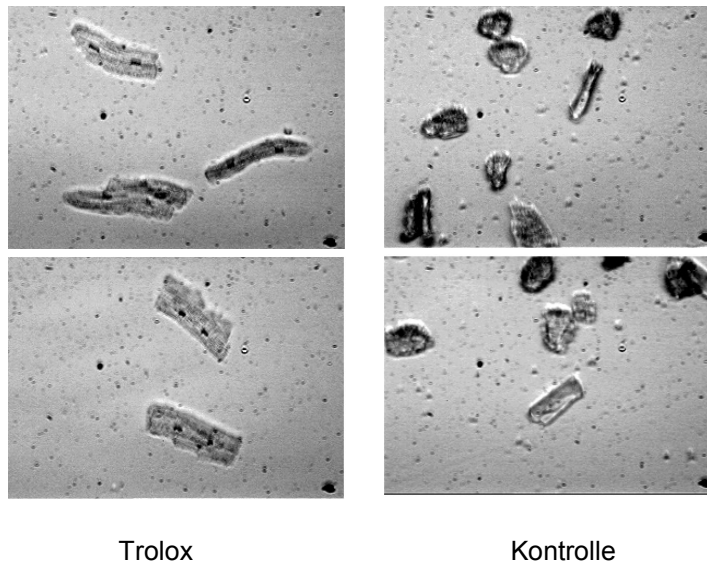


Abbildung 14: Zellmorphologie nach 24-stündiger Kaltinkubation in CCT-Medium

Repräsentative Darstellung der lichtmikroskopisch ausgewerteten Myokardzellen nach 24-stündiger Kaltinkubation in Trolox (1 mMol/l) und CCT-Medium (1 mMol/l) als Kontrollmedium.

Um den Einfluss der Konzentration von Trolox auf die Hyperkontraktion der Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Eine anschließend angefertigte Auswertung der Konzentrationswirkungskurve verdeutlicht eine deutliche Abhängigkeit der Hyperkontraktion von der Konzentration von Trolox (Abb. 15).

Dabei zeigten diese Zellen im gesamten Konzentrationsbereich von 0,01 mMol/l bis zu 1 mMol/l eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils an hyperkontrahierten runden Zellen. Es zeigte sich bei einer Konzentration von 1 mMol/l ein Wert von ca. < 2% an hyperkontrahierten Herzmuskelzellen (Abb. 15).

Die quantitative vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen vor einer 24-stündigen Kaltinkubation in Trolox ist in Abbildung 16 dargestellt. Es sind die prozentualen Anteile der vitalen bzw. stäbchenförmigen Ausgangszellen (ebenfalls die Kontrollzellen) bei Warminkubation bei verschiedenen Konzentrationen graphisch dargestellt.

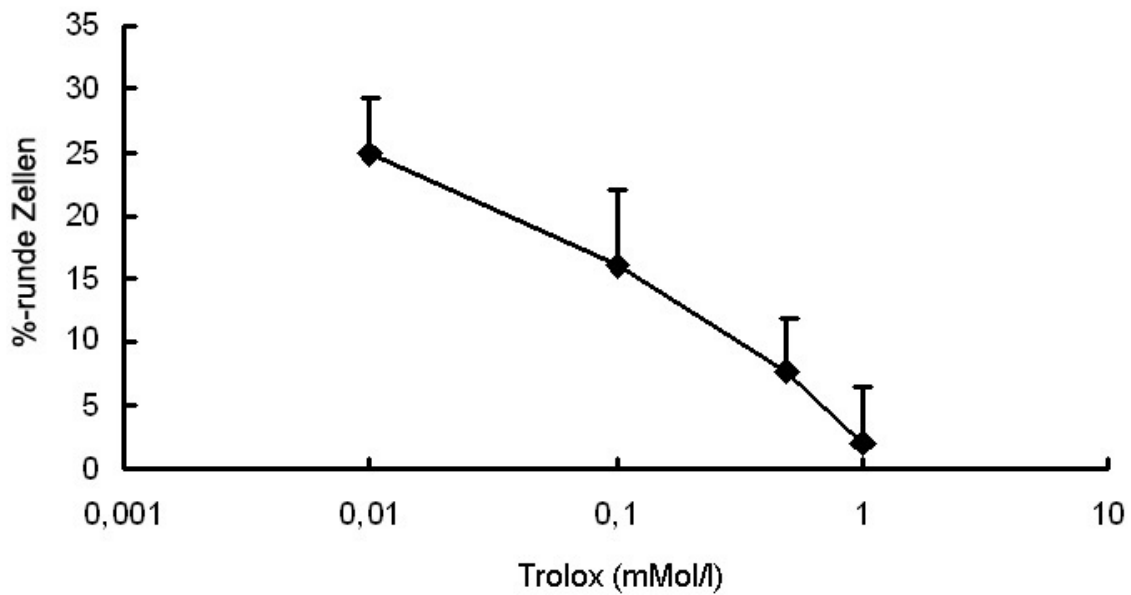


Abbildung 15: Konzentrationswirkungskurve von Trolox

Darstellung der Konzentrationswirkungskurve von Trolox unter Kaltinkubation auf die Hyperkontraktion von Herzmuskelzellen. * $p < 0,05$ vs. nicht Trolox behandelte Zellen, $n=4$ Präparationen.

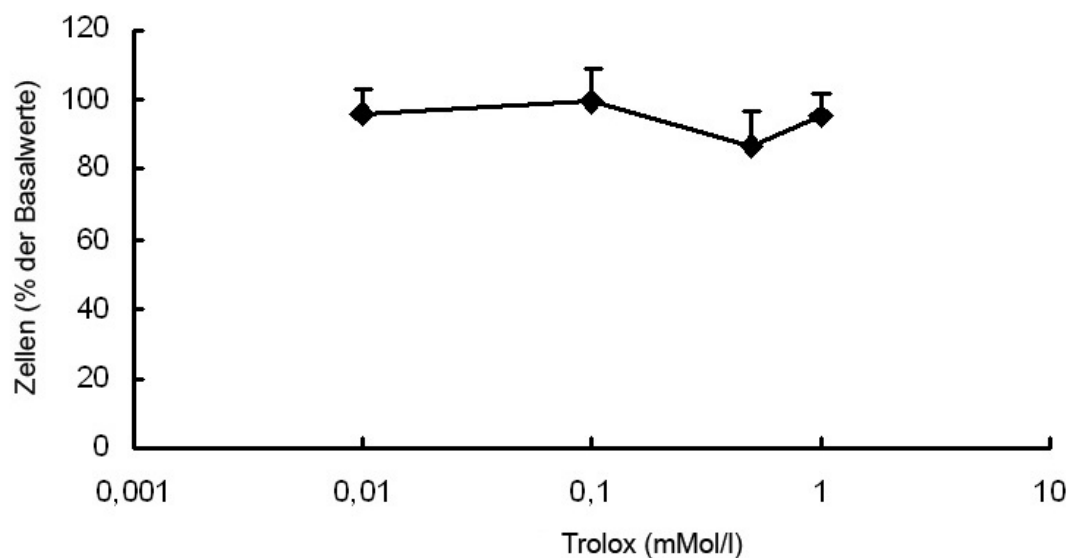


Abbildung 16: Einfluss von Trolox auf die Anheftung der Herzmuskelzellen

Vergleichende graphische Darstellung des Einflusses von Trolox auf die Anheftung der Herzmuskelzellen. Darstellung der Basalwerte der Konzentrationswirkungskurve von Trolox. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ Präparationen.

Zusätzlich wurden Untersuchungen auf das Verhalten der Zelllänge durchgeführt (Abb. 17).

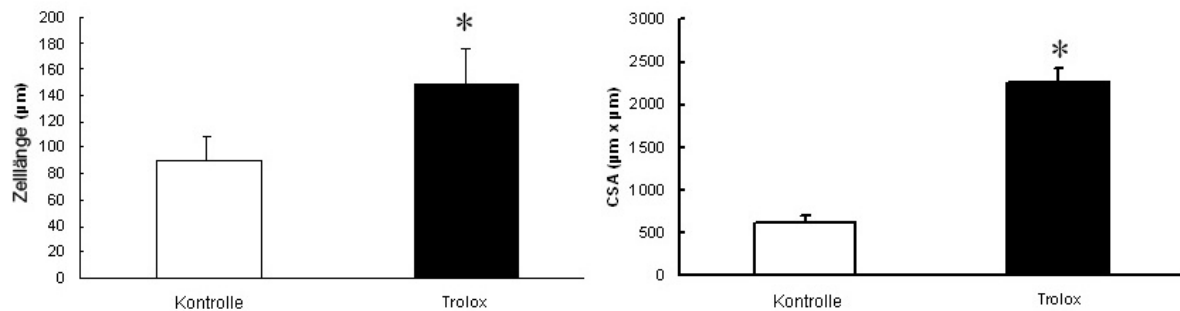


Abbildung 17: 24-stündige Kaltinkubation- und Warminkubation in Trolox

Darstellung des Einflusses der 24-stündigen Kaltinkubation der Herzmuskelzellen mit Trolox (1 mMol/l) im Kulturmedium CCT (1 mMol/l) mit anschließender Erwärmung auf das Verhalten der Zelllänge isolierter Herzmuskelzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler für die relative Zellverkürzung. *, $p < 0,05$ vs. Warminkubation, $n=120$ Zellen

4.3 Induktion von Apoptose durch Trolox bei Kälteinkubation

Um den Einfluss der 24-stündigen Kaltinkubation der Myokardzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT auf das apoptotische Verhalten von isolierten Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit Trolox inkubiert und mittels HOE-Färbung das apoptotische Verhalten dargestellt.

Differenziert wurde zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wiesen die mit Trolox inkubierten Zellen einen deutlich erkennbar höheren Anteil an apoptotischen Zellen auf (Abb. 18), während die Kontrollzellen einen signifikant höheren Anteil an nekrotischen Zellen aufwiesen.

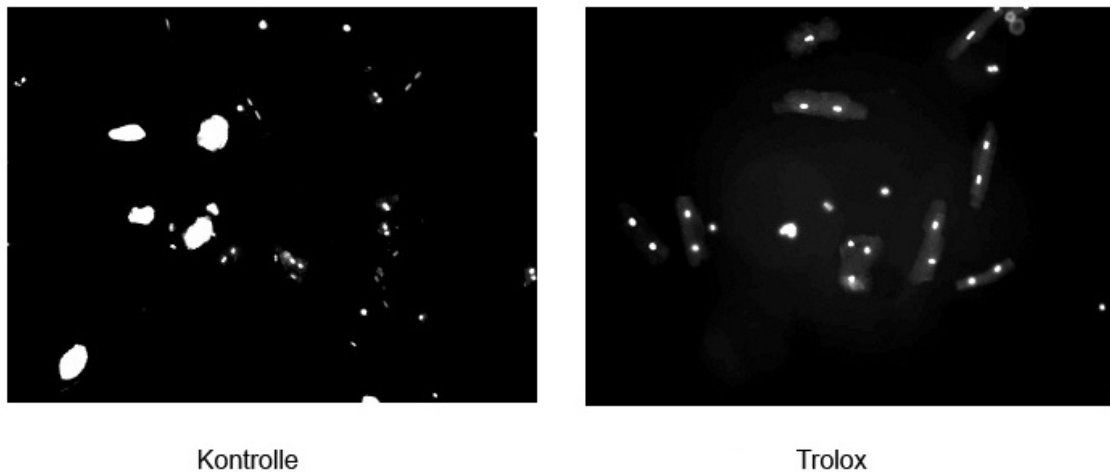


Abbildung 18: Zellmorphologie nach 24-stündiger Kaltinkubation mit Trolox mittels HOE-Färbung.

Repräsentative, vergleichende Darstellung der Zellmorphologie mittels HOE-Färbung der Herzmuskelzellen nach 24-stündiger Kaltinkubation in CCT-Medium (1 mMol/l) und Trolox (1 mMol/l). Dargestellt sind apoptotische, nekrotische und stäbchenförmige Zellen.

Eine sich anschließende quantitative Untersuchung einer 24-stündigen Kaltinkubation der Myokardzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT auf das nekrotische bzw. apoptotische Verhalten isolierter Herzmuskelzellen zeigte einen signifikant niedrigen Anteil an nekrotischen Zellen, sowohl bei Trolox als auch bei den Kontrollzellen. Der Anteil an stäbchenförmigen und apoptotischen Zellen zeigte mit einem Anteil von nahezu 80% keine merkbarer Unterschied in der Auswertung (Abb. 19).

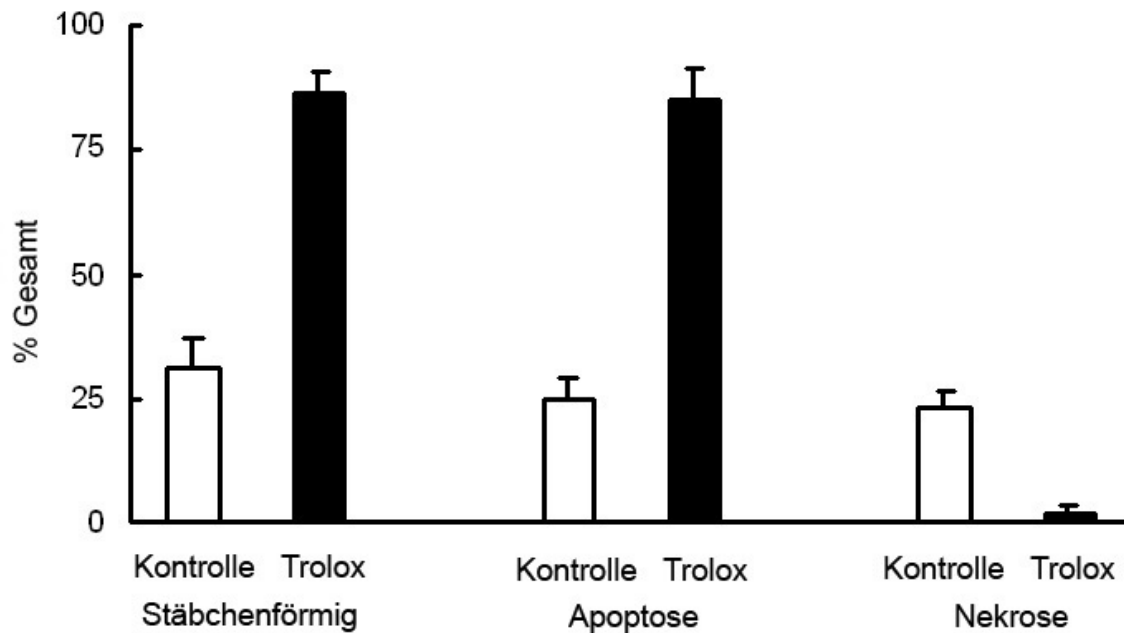


Abbildung 19: 24-stündige Kaltinkubation in CCT-Medium (HOE-Färbung)

Quantitative, vergleichende Darstellung mittels HOE-Färbung der prozentualen Anteile an stäbchenförmigen, apoptotischen und nekrotischen Zellen nach 24-stündiger Kaltinkubation in CCT-Medium (1 mMol/l) vs. Trolox (1 mMol/l), MW \pm SEM, n=4 Präparationen.

4.4 Einfluss der Wiedererwärmung von Trolox geschützten Kardiomyozyten

Um den Einfluss einer Wiedererwärmung nach 20-stündiger Kaltinkubation der Myokardzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT auf das Verhalten der Hyperkontraktion der Zellen zu untersuchen, wurden die isolierten Herzmuskelzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT über Nacht bei Kaltlagerung (4°C) inkubiert. Die lichtmikroskopische Auszählung erfolgte 24 Stunden später.

Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des prozentualen Anteils von 20% auf 80% an hyperkontrahierten Zellen im Kulturmedium CCT, während bei den mit Trolox inkubierten Zellen ein signifikanter Anstieg erst nach einer Kaltinkubationszeit von 20 Stunden erreicht wird (Abb. 20), also während der Wiedererwärmung.

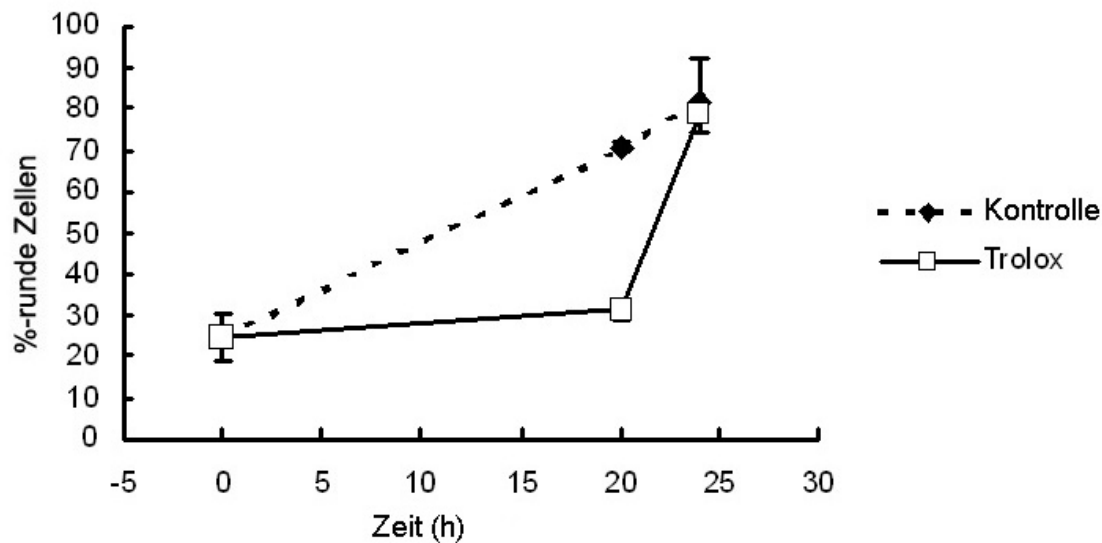


Abbildung 20: 24-stündige Kalt- und Warminkubation in Trolox

Darstellung der 24-stündigen Kalt- und Warminkubation von Trolox (1 mMol/l) in CCT-Medium (1 mMol/l) mit anschließender Erwärmung in CCT. Isolierte Herzmuskelzellen wurden mit Trolox im Kulturmedium CCT über Nacht bei Kaltlagerung (3°C) inkubiert und anschließend wiedererwärmt. Die lichtmikroskopische Auszählung erfolgte 24 Stunden später, MW +/- SEM, n=4 Präparationen.

4.5 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die Herzmuskelzellen in Wärme

Um den Einfluss der Testmedien LK 614, LK 6161, Desferal und Trolox unter normothermen Bedingungen zu untersuchen bzw. zu vergleichen, wurden die Myokardzellen einer 24-stündigen Warminkubation unterzogen.

Die Myokardzellen wurden inkubiert und am darauffolgenden Tag lichtmikroskopisch ausgewertet.

Während sich bei dem Kulturmedium und den Testmedien LK 614, LK 616 und Desferal mit prozentualen Werten von unter 10% an hyperkontrahierten Herzmuskelzellen keine signifikanten Unterschiede bei der sich anschließenden Auszählung ergaben, differenzierte sich Trolox deutlich von den anderen Testmedien mit einem Wert von über 30% (Abb. 21).

Trolox weist demnach eine deutlich schädigende Wirkung bei Warminkubation auf.

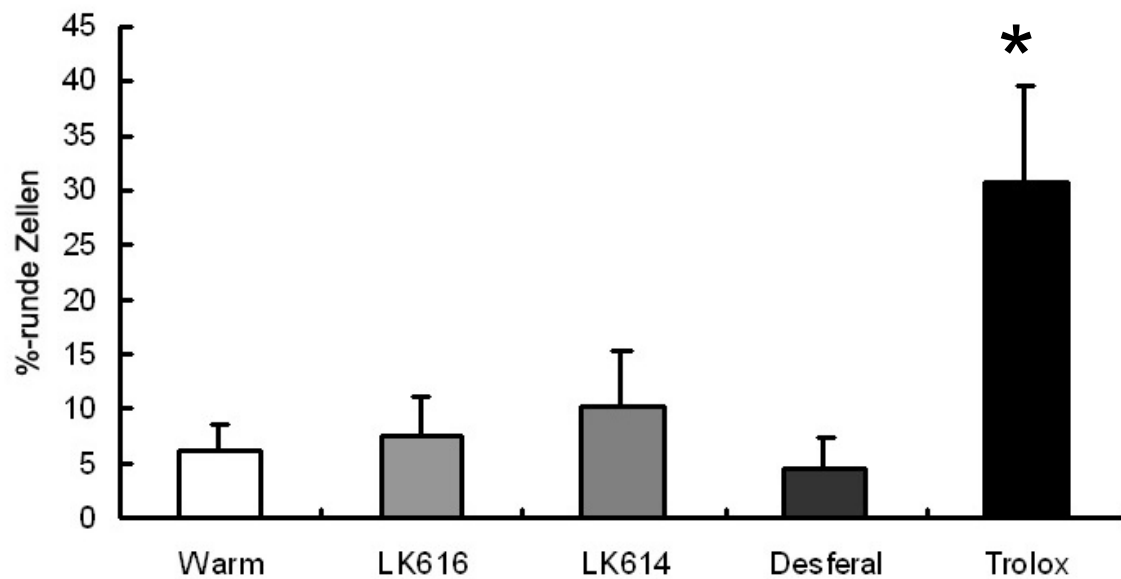


Abbildung 21: 24-stündige Warminkubation in CCT-Medium

Einfluss der 24-stündigen Warminkubation in CCT (Kulturmedium, 1 mMol/l) verglichen mit den Testmedien KL 614, LK 6161, Desferal und Trolox (jeweils 1mMol/l). Die Herzmuskelzellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium (CCT) und Testmedien optisch ausgezählt und die Mittelwerte verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 4$ Präparationen. *, $p < 0,05$ vs. Warminkubation.

4.6 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung in HTK-Lösung

Um den Einfluss einer 24-stündigen Kaltinkubation der Herzmuskelzellen mit den verschiedenen Testzusätzen Trolox, Desferal, LK 614, LK 616 mit anschließender Erwärmung auf das Hyperkontraktionsverhalten an isolierten Herzmuskelzellen in HTK-Lösung zu untersuchen, wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit Trolox, Desferal, LK 614, LK 616 über 24 Stunden bei 4°C in HTK-Lösung inkubiert und am darauffolgenden Tag 6 Stunden bei 37°C wieder erwärmt.

Im Unterschied zu den Kontrollzellen, bei denen sich eine deutliche Differenz im prozentualen Unterschied zwischen warmischämischer und kaltischämischer Lagerung zeigte (Abb.22), ließ sich bei den Testmedien kein signifikanter Unterschied erkennen.

Die quantitative, vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen vor einer 24-stündigen Kaltinkubation in HTK-Lösung mit LK 614, LK 616, Desferal und Trolox ist in Abb. 23 dargestellt. Es sind die prozentualen Anteile der vitalen bzw. stäbchenförmigen Ausgangszellen (ebenfalls die Kontrollzellen) bei Warminkubation graphisch dargestellt. Es zeigt sich hierbei kein deutlicher Unterschied in den Testzusätzen LK 614, LK 616 und Desferal, lediglich Trolox weist im Vergleich einen deutlich niedrigeren Ausgangswert an stäbchenförmigen Zellen auf.

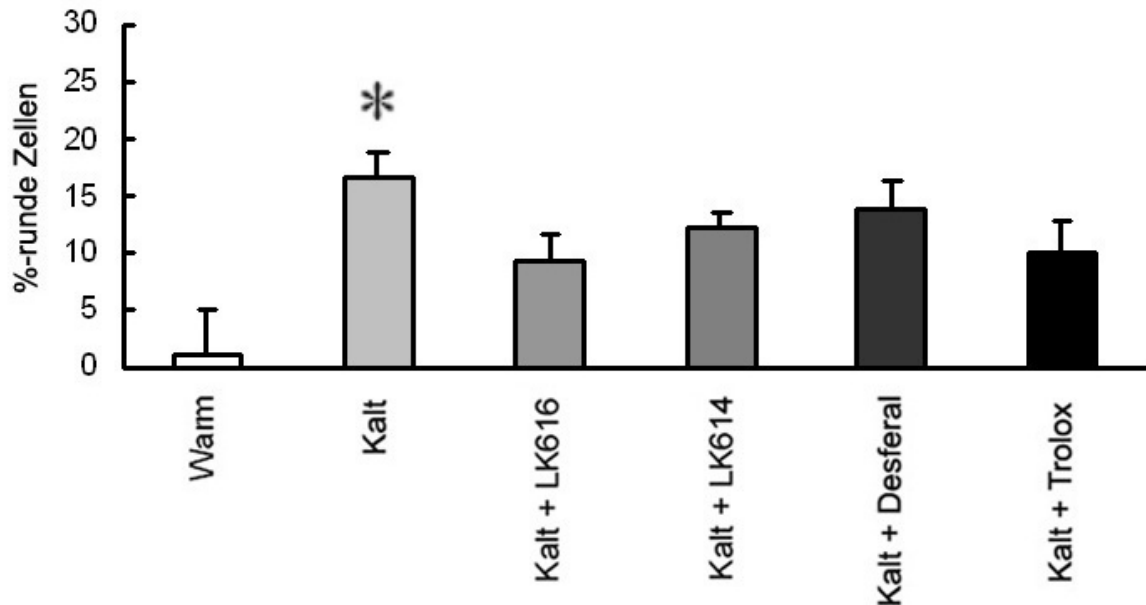


Abbildung 22: 24-stündige Kalt- und Warminkubation in Trolox

Einfluss der 24-stündigen Kaltinkubation der Myokardzellen mit Trolox (1 mMol/l) in HTK-Lösung mit anschließender Erwärmung auf das Hyperkontraktionsverhalten an isolierten Herzmuskelzellen, MW \pm SD, n=4 Präparationen, *p < 0,05 vs. Warminkubation.

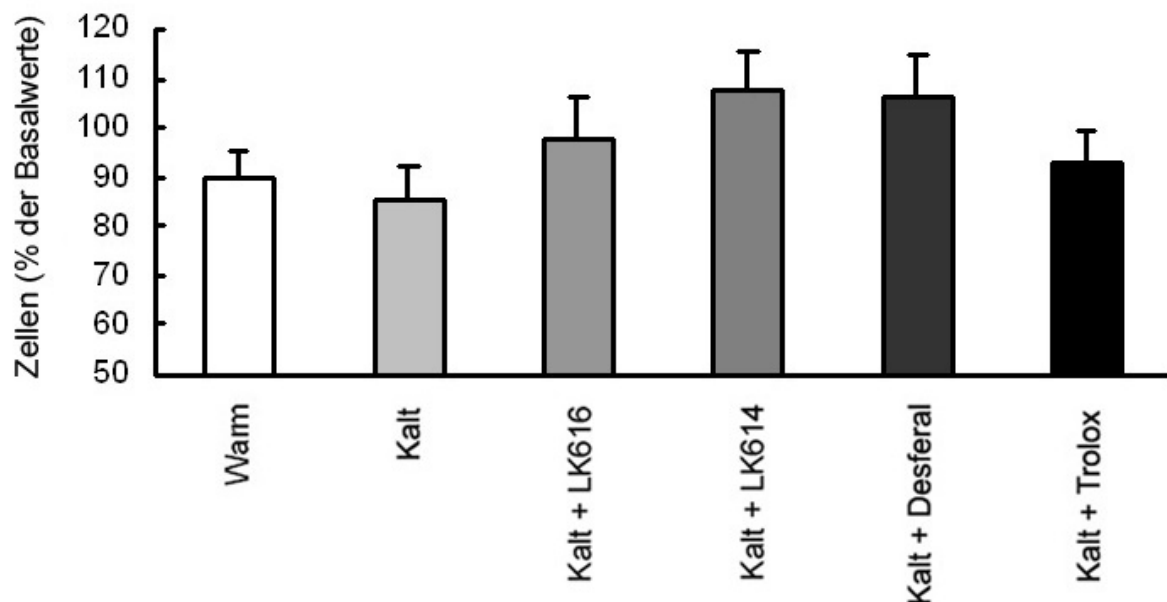


Abbildung 23: 24-stündige Kaltinkubation in HTK-Lösung

Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen vor einer 24-stündigen Kaltinkubation in HTK-Lösung, LK 614, LK 616, Desferal und Trolox (jeweils 1 mMol/l). Dargestellt sind die prozentualen Anteile der vitalen bzw. stäbchenförmigen Ausgangszellen ebenfalls die Kontrollzellen bei Warminkubation., * p < 0,05 vs. Warminkubation, n= 4 Präparationen.

4.7 Einfluss der Wiedererwärmung in HTK-Lösung auf die Zellschädigung

Um den Einfluss der 24-stündigen Kaltinkubation in HTK-Lösung zu untersuchen, wurden die isolierten Herzmuskelzellen über Nacht mit HTK-Lösung im Kulturmedium CCT inkubiert und lichtmikroskopisch ausgewertet, diese erfolgte jeweils direkt nach Inkubation und 24 Stunden nach Inkubation.

Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Auswertung des prozentualen Anteils an runden Zellen bei der Anwendung von HTK-Lösung mit Kaltinkubation und anschließender Erwärmung (Abb. 24). Während bei einer reinen Kaltlagerung der Herzmuskelzellen in HTK-Lösung und einer Inkubation der Zellen in CCT-Lösung kein wesentlicher Unterschied in der prozentualen Auswertung an runden Zellen zu erkennen ist, ist bei einer Kaltlagerung der Myokardzellen in HTK-Lösung mit einer Erwärmung nach 20 Stunden ein signifikanter erhöhter Anteil an runden Zellen zu erkennen.

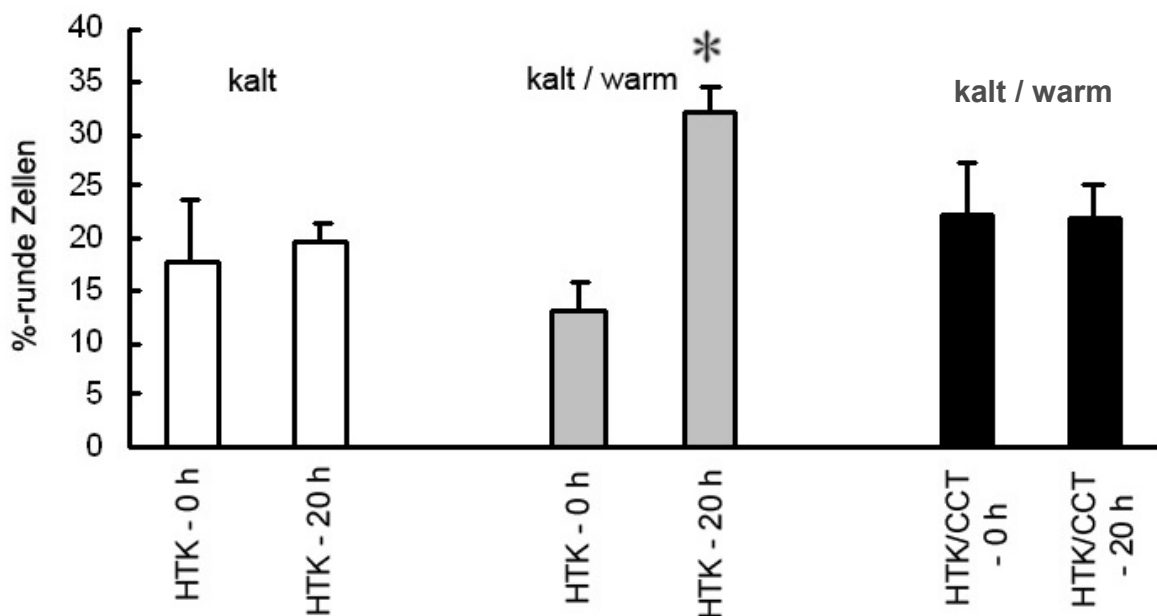


Abbildung 24: 24-stündige Kaltinkubation in HTK-Lösung

Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an runden/nekrotischen Zellen nach Kaltinkubation mit HTK-Lösung (1 mMol/l) im Kulturmedium CCT. Die Zellen (n=24) wurden direkt am Tag der Inkubation und nach 24-stündiger Kaltinkubation ausgewertet. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an hyperkontrahierten Zellen. *, $p < 0,05$ vs. Warminkubation, n= 4 Präparationen

4.8 Einfluss von Eisenchelatoren und Radikalfängern auf die kälteinduzierte Zellschädigung in Na-Lösung

Um den Einfluss von Na-Ionen auf das Hyperkontraktionsverhalten von isolierten Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen über Nacht (20 Stunden) mit Na30La (bei kaltischämischer Lagerung) und CCT-Kulturmedium als Kontrollzellen (bei warmischämischer Lagerung) inkubiert, am darauffolgenden Tag für 4 Stunden im Kulturmedium CCT wiedererwärmt und lichtmikroskopisch ausgewertet (Abb. 25). Vergleichend dazu erfolgte eine Versuchsserie mit Na30La, die durch HTK-Lösung ersetzt wurde.

Dabei zeigt sich in der Versuchsserie mit Na30La und den Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an hyperkontrahierten Zellen, nach 20-stündiger Inkubationszeit erfolgt ein minimaler Anstieg an hyperkontrahierten Zellen in der Na30La-Kurve. Jedoch zeigte sich in der vergleichenden Versuchsserie mit der HTK-Lösung ein deutlicher Anstieg nach 20 Stunden Inkubation (Abb.25 (A)).

Keine signifikanten Unterschiede wiesen die Testmedien Na30La/0, Na30La/K und Na30La/D in Bezug auf das Hyperkontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen auf (Abb. 25 (B)).

Lediglich Na30La/T zeigte nach 20-stündiger Kaltinkubation einen deutlichen Anstieg an hyperkontrahierten Zellen (Abb. 25 (C)).

Eine anschließend angefertigte zusammenfassende quantitative Auswertung der prozentualen Anteile an runden Zellen unter dem Einfluss verschiedener Na-Testmedien bei 24-stündiger Kaltinkubation auf das Hyperkontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen zeigt bei den Testzusätzen Na30, Na30/K, Na30/O und Na30/D mit Werten unter 25% keine deutlichen Unterschiede in den prozentualen Anteilen an runden Zellen. Na30/T hingegen zeigt mit einem Wert von über 60% einen deutlichen Anteil an hyperkontrahierten Zellen (Abb. 26).

Die Darstellung der Basalwerte bzw. der prozentualen Anteile an stäbchenförmigen Ausgangszellen ist aus Abbildung 27 zu entnehmen. Während die Kontrollzellen in Wärme, die mit Na30 und Na30/O inkubierten Zellen mit Werten über 60% sich nicht wesentlich unterscheiden, zeigten die mit Na30/K, Na30/T und Na30/D inkubierten

mit Werten unter 50% einen deutlicheren geringeren Anteil an stäbchenförmigen Ausgangszellen.

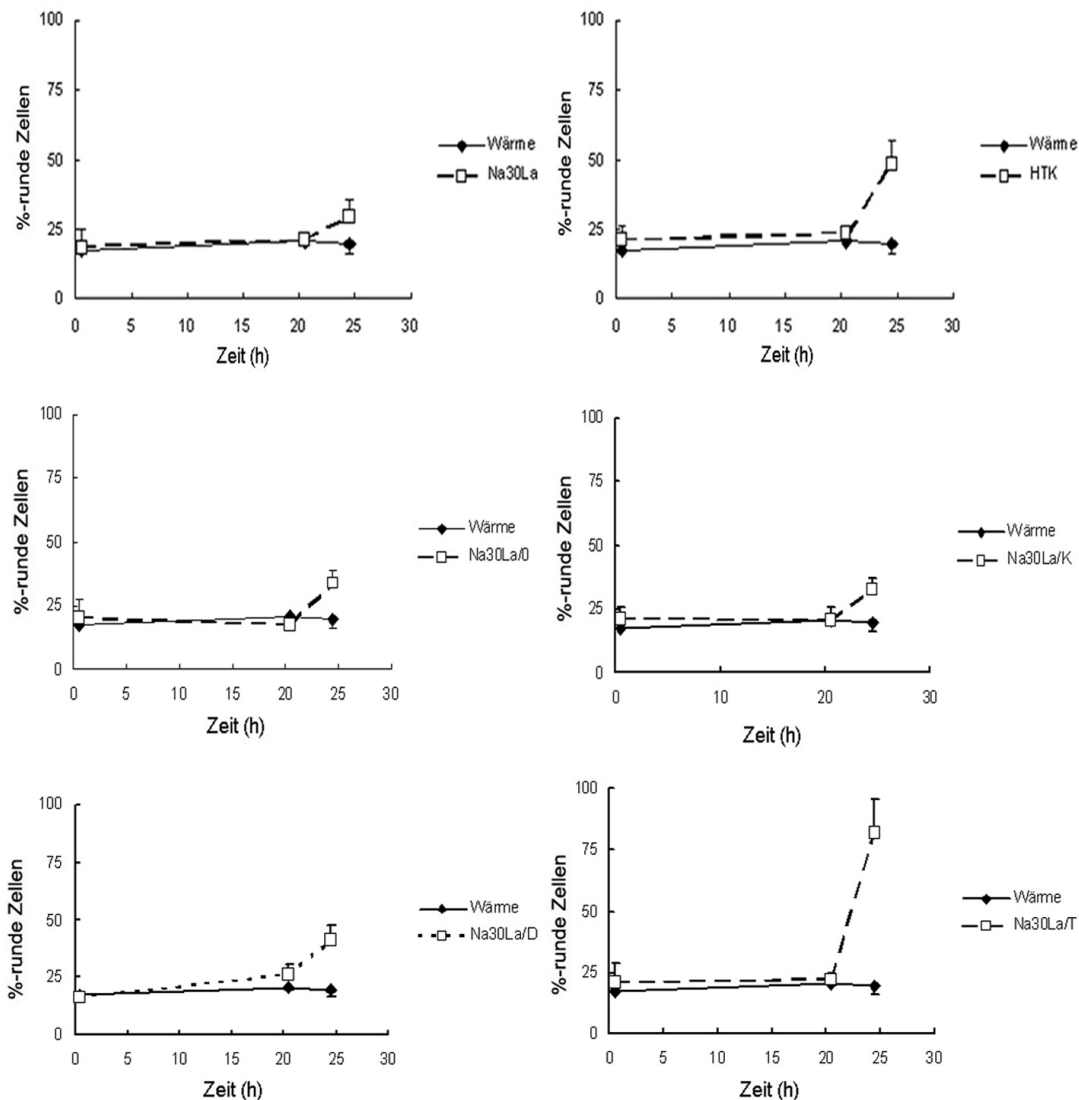


Abbildung 25: Einfluss von Na^+ -Ionen bei 24-stündiger Kaltinkubation

Graphische Darstellung des Einflusses verschiedener Na-Testmedien bei 24-stündiger Kaltinkubation auf das Hyperkontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen. Die Zellen ($n=24$) wurden über Nacht mit den Na-Testmedien (jeweils 1 mMol/l) kaltinkubiert und am darauffolgenden Tag lichtmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für den prozentualen Anteil an runden Zellen mit Na30La verglichen mit HTK-Lösung (1 mMol/l) (A), Na30La/0 im Vergleich mit Na30/K (B) und Na30a/D verglichen mit Na30La/T (C).

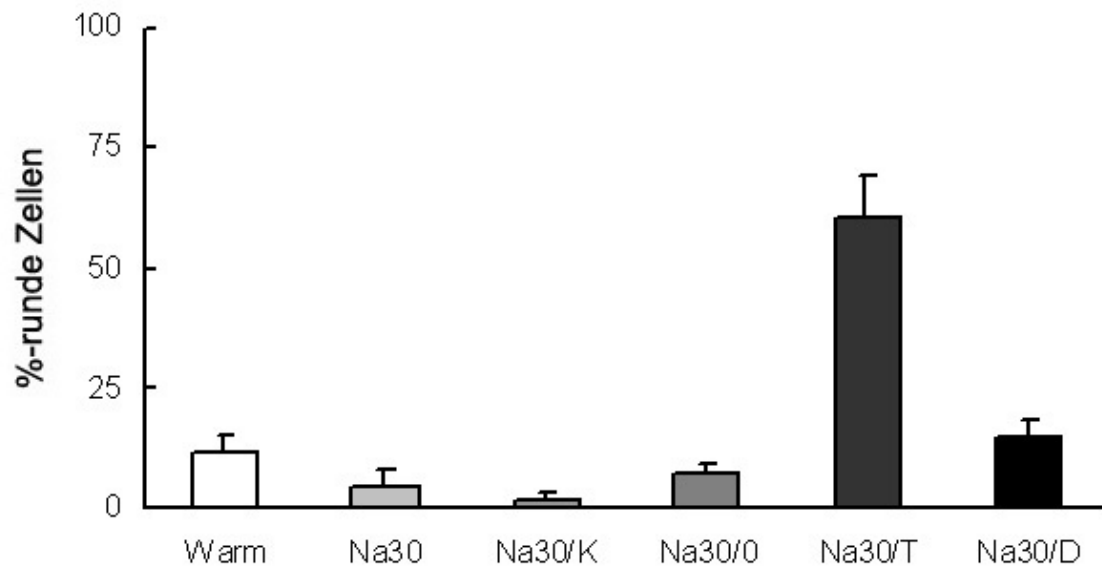


Abbildung 26: Einfluss von Na^+ -Ionen bei einer 24-stündigen Kaltinkubation

Graphische Darstellung des Einflusses verschiedener Na^+ -Testmedien bei 24-stündiger Kaltinkubation auf das Hyperkontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen. Die Zellen ($n=24$) wurden über Nacht mit den Na^+ -Testmedien (jeweils 1 mMol/l) kaltinkubiert und am darauffolgenden Tag lichtmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind ebenfalls die prozentualen Anteile an Kontrollzellen nach 24-stündiger Warminkubation im Kulturmedium CCT (1 mMol/l), MW \pm SEM.

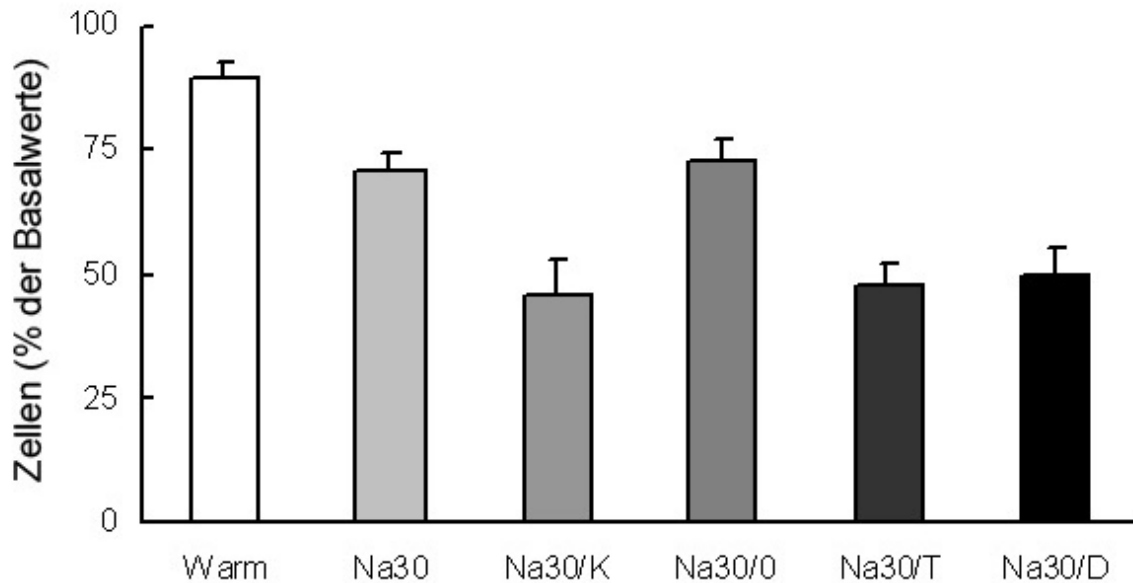


Abbildung 27: Basalwerte bei 24-stündiger Kaltinkubation

Graphische Darstellung der Basalwerte bei 24-stündiger Kaltinkubation. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der vitalen bzw. stäbchenförmigen Ausgangszellen, ebenfalls die der Kontrollzellen bei Warminkubation.

4.9 Einfluss von HTK- und Na-Lösung auf die Zellmorphologie

Um den Einfluss von Na^+ - und HTK-Lösung bei Kaltinkubation und anschließender Warminkubation auf das Verhalten der Zelllänge isolierter Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden die isolierten Herzmuskelzellen für 20 Stunden im Kontrollmedium CCT mit Na30 und im Vergleich mit HTK-Lösung kaltinkubiert (4°C) und am darauffolgenden Tag für 4 Stunden wiedererwärmt (37°C). Abbildung 28 verdeutlicht die anschließende lichtmikroskopische Auswertung der Zelllängenuntersuchung (μm). Hierbei zeigt sich bei den Kontrollzellen und den mit HTK-Lösung inkubierten Zellen kein signifikanter Unterschied. Deutlich, mit Werten unter $90 \mu\text{m}$, grenzen sich hingegen die mit Na30 inkubierten Zellen ab.

Abbildung 29 zeigt repräsentative Bilder für die unter Abbildung 28 gezeigten Werte.

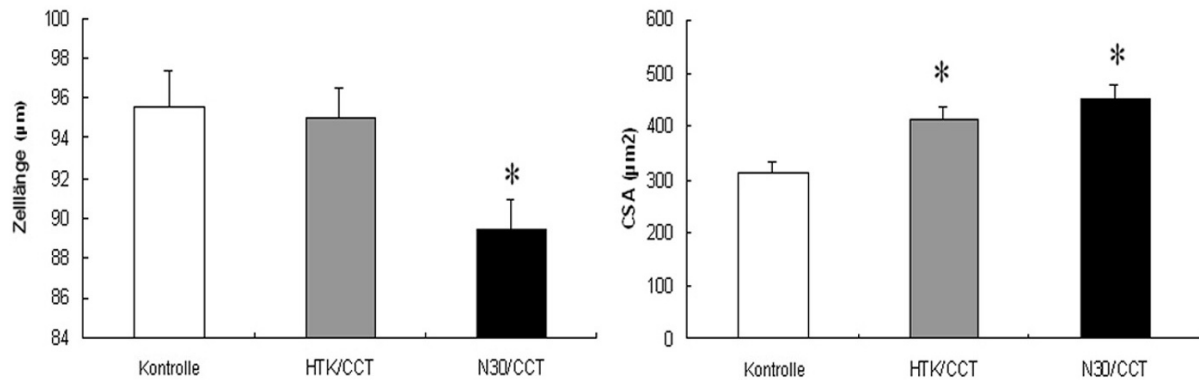
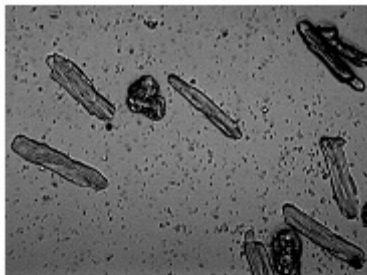
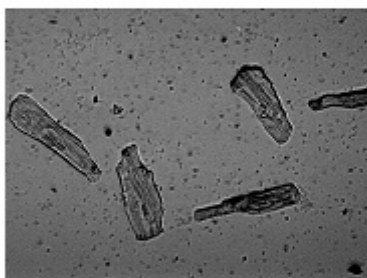


Abbildung 28: Einfluss von Na⁺-Ionen bei 24-stündiger Kalt- und Warminkubation

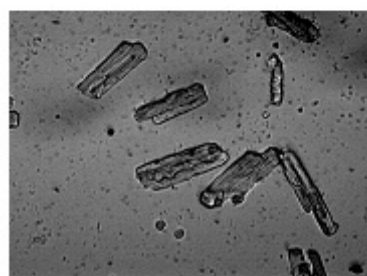
Quantitative Darstellung des Einflusses von Na⁺-Ionen (jeweils 1 mMol/l) und HTK-Lösung (1 mMol/l) bei Kaltinkubation und anschließender Warminkubation auf das Verhalten der Zelllänge isolierter Herzmuskelzellen. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über 20 Stunden in Kontrollmedium CCT mit Na30 und HTK inkubiert und bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden sie für 4 Stunden bei 37°C wiedererwärmt und lichtmikroskopisch ausgewertet, MW + SE, n=120 Zellen, *p < 0,05 vs. Kontrolle.



Kontrolle (24-Stunden Wärme)



20-Stunden-HTK kalt; 4-Stunden Wiedererwärmung in CCT



20-Stunden N30 kalt; 4-Stunden Wiedererwärmung in CCT

Abbildung 29: 24-stündige Warm- und Kaltinkubation

Repräsentative Darstellung der lichtmikroskopischen Auswertung. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Kontrollmedium CCT (1 mMol/l), HTK (1 mMol/l) und Na30 (1 mMol/l) inkubiert, anschließend für 4 Stunden in dem Kulturmedium CCT wiedererwärmt und im Anschluss lichtmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die zu vergleichenden Zelllängen nach einer 24-stündigen Warminkubation (37°C) in CCT-Medium (A), einer 20-stündigen Kaltinkubation (4°C) in HTK-Lösung mit anschließender 4-stündiger Wiedererwärmung (37°C) in CCT-Medium (B) und einer 20-stündigen Kaltinkubation (4°C) in Na30 mit anschließender 4-stündiger Wiedererwärmung (37°C) in CCT-Medium (C).

4.10 Einfluss von HTK- und Na⁺-Lösung auf die Zellfunktion

Um den Einfluss von Na⁺-Ionen und HTK-Lösung bei Kaltlagerung und anschließender Erwärmung auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Na30 und HTK für 20 Stunden kaltinkubiert, am darauffolgenden Tag für 4 Stunden im Kulturmedium CCT wiedererwärmt und elektrisch stimuliert (jeweils mit 0,5, 1 und 2 Hz) (Abb. 30).

Die Bestimmung der Zellverkürzungsparameter erfolgte vergleichend mit und ohne Verwendung von Isoprenalin zur Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren.

Die Kontraktion der Herzmuskelzellen wurde unter elektrischer Stimulation in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Als Grad für die Kontraktion der Zelle wurden deren prozentuale Verkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit berechnet. Die Zellen wurde dabei mit unterschiedlichen Frequenzen im Bereich von 0,5 bis 2,0 Hz stimuliert. Abb. 30 zeigt repräsentativ die relative Zellverkürzung bei 2 Hz. Während in den CCT kaltinkubierten Herzmuskelzellen keine Stimulierbarkeit mehr erreicht werden konnte, ließen sich die Herzmuskelzellen nach Protektion mit Na30 und HTK stimulieren und eine β -adrenerge Ansprechbarkeit nachweisen.

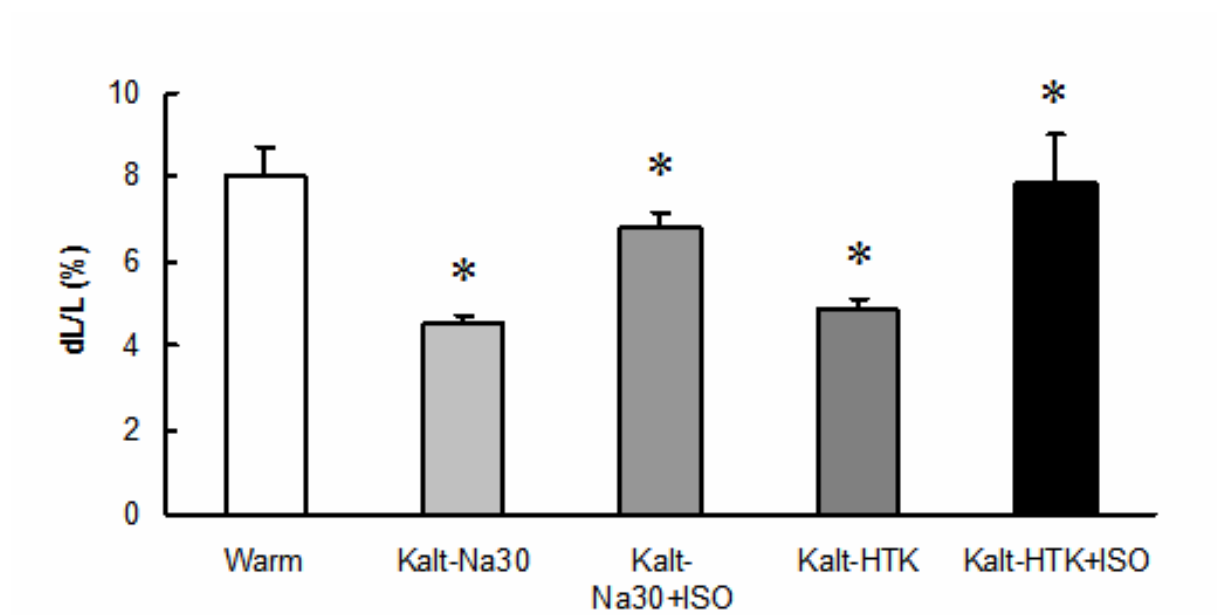


Abbildung 30: Einfluss von Na^+ -Ionen bei Kalt- und Warminkubation

Einfluss von Na^+ -Ionen und HTK-Lösung bei Kaltinkubation und anschließender Warminkubation auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen. Isolierte Herzmuskelzellen wurden über 20 Stunden in Kontrollmedium CCT mit Na30 (1 mMol/l) und HTK (1 mMol/l) inkubiert und bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden sie für 4 Stunden bei 37°C wiedererwärmt. Die elektrische Stimulation erfolgte zum Teil in Gegenwart von Isoprenalin. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler für die relative Zellverkürzung. * $p < 0,05$, $n = 4$ Präparationen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Kardioprotektionslösungen stehen auch weiterhin im Mittelpunkt vieler klinischer Studien und tierexperimenteller Untersuchungen. Gemeinsame Ziele sind eine Verkürzung der Ischämiezeit und eine Minimierung des Reperfusionsschadens.

Selbst nach jahrelangen Forschungen hat sich keine optimale Konservierungslösung behaupten können. Untermauert wird diese Behauptung durch die Tatsache, dass europaweit keine zwei Transplantationszentren dieselbe Konservierungslösung anwenden (KIRK et al., 1993).

Bereits existierende etablierte Studien des Jahres 2004, durchgeführt unter der Leitung von Fr. Dr. Rauen an der Universität Essen, an Leber- und Nierenendothelzellen beschreiben den Vorgang der kälteinduzierten Ischämie auf zellulärer Ebene.

Untersucht werden sollte darauf basierend der Vorgang der Kaltischämie mit Folgeschäden und deren Verhinderung auf zellulärer Ebene an Myokardzellen. Es sollte geklärt werden, ob die durchgeführten Versuche an Leber- und Nierenendothelzellen auf Myokardzellen übertragbar sind.

Des Weiteren sollten Vergleiche mit etablierten Versuchsmodellen aufgezeigt werden.

5.2 Diskussion des angewendeten Versuchmodells

Die Entscheidung, die Versuche auf zellulärer Ebene durchzuführen, erfolgte auf Grund der Tatsache, dass bereits hervorragende Ergebnisse bezüglich wissenschaftlich anerkannter Mechanismen der Kälteschädigung relevanter Zelltypen (u.a. Hepatozyten, Leberendothelzellen, Nierenzellen) existieren (DE GROOT et al., 1995, RAUEN et al. 1998).

Diese Art der durchgeführten experimentellen Untersuchung ist als Grundlage für weitere folgende klinische Studien sicherlich geeignet. Die mögliche Übertragbarkeit in Bezug der Anwendung auf den Menschen bedarf sicherlich noch weiterer Studien am Großtiermodell, die zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch nicht geplant sind.

Für die Verwendung von Rattenmyokardzellen als Versuchsobjekt spricht in diesem Fall die Möglichkeit der hohen Anzahl an Versuchstieren bzw. Versuchen, die relative Ähnlichkeit der Zellstrukturen mit denen des Menschen und die damit verbundene positive Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus. Generell besteht jedoch in Fachkreisen keine Einigkeit darüber, welches Tier im Vergleich am besten geeignet ist (KIRK et al., 1993).

5.3 Möglichkeiten des Versuchsmodells

Die Organkonservierung stellt einen wichtigen Schritt in der Transplantationsmedizin dar. Mit dem Fortschritt der Transplantationsmedizin wurden im Laufe der Zeit sowohl die Operationstechniken als auch die Möglichkeiten der Organkonservierung, wie z.B. die Gewebeprotektion während der Ischämiephasen, weiterentwickelt.

Ziel ist eine adäquate Konservierung des zu verpflanzenden Organs mit einer möglichst geringen Ischämiezeit. Die Ischämiezeit ist definiert als Zeitspanne, in der das potentielle Spenderorgan aus dem Spenderorganismus explantiert und im Empfängersystem mit der physiologischen Blutversorgung wieder eingesetzt wird. Während der Ischämiezeit ist das Organ von jeglicher Blut- bzw. Nährstoffversorgung abgeschnitten. Dies führt zu einem Mangel an sauerstoff- und energiereichen Substanzen, verhindert aber auch gleichzeitig den Abtransport anfallender bzw. sich anstauender, eventuell toxischer Metabolite. Da zu diesem Zeitpunkt die Myokardzellen auch keine Möglichkeit haben, Energie aus dem Sauerstoff zu gewinnen, wird Glukose abgebaut und daraus der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) gebildet, allerdings nicht in ausreichenden Mengen. Die ansteigende Laktatkonzentration führt zu einer Auslenkung des Gleichgewichts des Säure-Basen-Haushalts, der sogenannten Azidose. Durch den Zustand der Azidose werden diverse Enzyme in ihrer katalytischen Funktion gehemmt. Mit der Zunahme der Azidose in den Zellen und dem dadurch bedingten Energiemangel kommt es zu einer dauerhaften Schädigung der Myokardzellen (AMRANI et al., 1999).

Zur Lagerung von Organen bzw. Zellgeweben wird neben verschiedenen Konservierungslösungen unterstützend auch Hypothermie eingesetzt, um v. a. die durch Sauerstoff- bzw. Substratmangel hervorgerufene Gewebe- und Zellschädigung durch Verminderung des Metabolismus eine Reduktion der Schädigungsprozesse

hervorzurufen und damit das Gewebe vor den Folgen eines Sauerstoffmangels zu schützen. Bereits existierende Studien mit Untersuchungen an Nierengewebe, Hepatozyten und verschiedenen Endothelzellen haben bewiesen, dass Kälte selbst eine Zellschädigung hervorrufen kann (DE GROOT et al., 1995), ausgelöst durch kälteinduzierte Apoptose über reaktive Sauerstoffmoleküle. Versuche zeigten, dass die kälteinduzierte Apoptose durch intrazellulär wirkende Eisenchelatoren und Radikalfänger vollständig verhindert werden kann (RAUEN et al., 1997). Den reaktiven Sauerstoffspezies kommt eine strategische Rolle in der Pathogenese der Kälteschädigung zu. Niederreaktive Moleküle werden durch Eisenkatalyse in hochreaktive Radikale umgewandelt, als Beispiel ist an dieser Stelle das hochreaktive Hydroxylradikal zu nennen. An der Bildung dieser Radikale ist das chelatisierbare Eisen, das sogenannte „redox-aktive Eisen“, beteiligt. Aktuelle laufende Studien konnten bereits eine selektive Bestimmung, mittels Fluoreszenzmikroskopie, des mitochondrialen Ursprung des chelatisierbaren Eisens nachweisen.

In der vorliegenden Studie wurde eine Prüfung der Übertragbarkeit der bisher existierenden Ergebnisse an Leber- und Nierenendothelzellen bezüglich der kälteinduzierten Apoptose auf isolierte Herzmuskelzellen untersucht. Bisherige Studien über den kardialen Konservierungsschaden beschreiben hauptsächlich einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen im Organ selbst. Folge ist demnach ein Erliegen des aeroben Stoffwechsels mit intrazellulärer- und nachfolgend extrazellulärer Azidose. Ein Abbau des Hauptenergieträgers ATP zu ADP bewirkt eine Störung des intra- und extrazellulären Ionengleichgewichts mit Ausfall der Na^+ -Pumpe und einem Wassereinstrom in das Zellinnere. Eine Ödembildung mit Zellmembranruptur sind die Folgen (KIM et al., 2000).

Besondere Beachtung hinsichtlich des kardialen Ischämieschadens gilt dem Myokard. Es besitzt endogene kardioprotektive Mechanismen, die einer Ischämie autark entgegenwirken. Es wird aufgrund dieser Tatsachen auch als „hibernating“ Myokard bezeichnet. Das „hibernating“ Myokard beschreibt eine Verminderung der Funktion aufgrund mangelnder Durchblutung. Genauere Untersuchungen bzw. Studien bezüglich der myokardialen „Hibernation“ fehlen allerdings, wage

Vermutungen bezüglich verminderter Funktion kontraktile Elemente existieren (HEUSCH et al., 1997).

Aus diesem Hintergrund ist eine weitere aufklärende wissenschaftliche Untersuchung des Vorgangs der Kälteischämie auf Herzmuskelzellen interessant. Diese Studie untersuchte Methoden und Ursachen zur Verhinderung bzw. Reduktion der Schädigung durch die Anwendung verschiedenartig wirkender Konservierungslösungen.

5.4 Diskussion der Hypothermie

Der protektive Schutz der Hypothermie besteht in dem Schutz des jeweiligen Zellgewebes durch Minimierung bzw. einer Reduktion des jeweiligen Energieverbrauchs. Voraussetzung hierfür ist eine Reduzierung des zellulären Stoffwechsels. Es ist eine bekannte Tatsache, dass die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion im allgemeinen mit steigender Temperatur zunimmt. Die quantitative Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur wird durch die Arrhenius-Gleichung (Abbildung 12) beschrieben. Das naturwissenschaftliche Gesetz bezüglich des Verhältnisses der Reaktionsgeschwindigkeit zur Zeit, beschreibt die Reduktion der Geschwindigkeit einer Reaktion in einem Bioorganismus auf die Hälfte des Ausgangswertes bei einer Temperatursenkung um 10°C. Diese naturwissenschaftliche Gesetzmäßigkeit verdeutlicht eine gewisse Toleranzbreite bezüglich ischämischen Vorgängen.

$$k[1/d] = k_0 e^{E_A/R T}$$

Abbildung 31: Arrhenius-Gleichung

A präexponentieller Faktor oder Frequenzfaktor, entspricht nach der Stoßtheorie dem Produkt aus der Stoßzahl Z und dem Orientierungsfaktor P ,

E_A Aktivierungsenergie (Einheit: J/mol),

R allgemeine Gaskonstante = 8,314 J/(K mol)

T absolute (thermodynamische) Temperatur (Einheit: K).

Jedoch sind die natürlichen Grenzen der Hypothermie nicht zu vernachlässigen. In diesem Zusammenhang wird auch vom sogenannten „Eistod“ gesprochen (SINGER et al., 1990).

Bezeichnet wird damit die jeweilige Temperaturabhängigkeit der metabolischen Prozesse und damit das Gleichgewicht zwischen physikalischen Prozessen auf der einen Seite und den enzymatisch-katalytischen Reaktionen im Organismus auf der anderen Seite, die zu der bereits angesprochenen Stoffwechselauslenkung führen.

5.5 Ziel dieser Studie

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Mechanismus der myokardialen Kältezellschädigung zu identifizieren und Möglichkeiten zu entwickeln, dieser Schädigung mit neuen Strategien entgegenzuwirken.

Umgesetzt wurde dies durch Anwendung mit unterschiedlich zusammengesetzten Konservierungslösungen unter Hypothermie bei 4°C mit Wiedererwärmungsphasen bei 37°C. Eingesetzt wurden Eisenchelatoren, Natriumionen und Radikalfänger. Es sollte dadurch zum einen der Mechanismus der kaltischämischen Zellschädigung eingehender wissenschaftlich untersucht werden. Des weiteren sollte geklärt werden, inwieweit die angewendeten Substanzen protektiv wirken.

Es sollten zudem Vergleiche mit bereits etablierten kälteinduzierten ischämischen Studien auf zellulärer Ebene an Leber und Niere aufgezeigt werden (RAUEN et al., 1998).

Die Untersuchungen wurden an isolierten Herzmuskelzellen durchgeführt.

5.6 Eingesetzte Konservierungslösungen

Um das Problem der Gewebeschädigung bzw. den Reperfusionsschaden zu minimieren, standen verschiedene Konservierungsmethoden und Konservierungslösungen viele Jahre im Mittelpunkt der Forschung. Konservierungslösungen versuchen neben dem existierenden Aspekt der Protektion

des Myokards alleine durch Temperaturabsenkung zusätzlich die Ischämiezeit zu verlängern und den Reperfusionsschaden zu minimieren.

Grundlagen der Organprotektion wurden bereits 1988 von BELZER und SOUTHHARD beschrieben:

- 1) Vermeidung der zellulären Azidose
- 2) Vermeidung eines Reperfusionsschadens durch redox-aktive Sauerstoffradikale (ROS)

Die in der vorliegenden Studie angewendeten Konservierungslösungen sollten durch ihre unterschiedliche Zusammensetzung den Vorgang der kaltischämischen Zellschädigung wissenschaftlich aufklären. So wurden Eisenchelatoren (Desferal, HTK 614, HTK 616), Natriumionen und Antioxidantien (Trolox) im Vergleich mit bereits wissenschaftlich etablierten Konservierungsmitteln wie der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung angewendet.

In unserem Versuchsmodell wurden alle Rattenmyokardzellen, im Hinblick auf angestrebte längere Kaltischämiezeiten, mit der jeweiligen Konservierungslösung unter hypothermen Bedingungen bei 4°C für 12 Stunden kalt- und anschließend bei 37°C 6 Stunden warminkubiert. Im Anschluss wurden die jeweiligen Messungen bzw. Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 3 „Methodenteil“)

5.6.1 Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) als Konservierungsmittel

In der vorliegenden Studie wurde unter anderem HTK als Konservierungslösung verwendet. Hintergrund war der akzeptierte und stetige Gebrauch von HTK als Konservierungsmittel in der Herztransplantation zur Konservierung (HELLBERG et al., 1987, REICHENSPURNER et al., 1993). Bereits existierende experimentelle Studien konnten beweisen, dass mit der HTK-Lösung als Konservierungslösung Ischämiezeiten bis zu 24 Stunden möglich sind (LAMESCH, 1990).

Die chemische Zusammensetzung der Konservierungslösung aus den Hauptinhaltsstoffen Histidin, Tryptophan und α -Ketoglutarat stellen die Grundlage dieser Kardioplegielösung dar. Die Aminosäure Histidin, mit dem Histidin/Histidin-

HCL-Puffer, ermöglicht durch die hohe Konzentration eine Isoosmolarität. Histidin wird in der jeweiligen Konzentration von den Zellen aufgenommen und führt bereits bei 37°C zu einer eisenabhängigen Schädigung. Als wahrscheinliche Erklärung für diesen Vorgang wird eine intrazelluläre Bildung redox-aktiver Eisenkomplexe mit zellulärem, chelatisierbarem Eisen angenommen (RAUEN et al., 1997).

Der Inhaltsstoff Tryptophan verhindert einen unkontrollierten Einstrom von Histidin in die Myokardzellen. α -Ketoglutarat dient als Metabolit des aeroben Stoffwechsels.

Die HTK-Lösung verstärkt bei Hepatozyten, Leberendothelzellen, Nierentubuluszellen und Koronarendothelzellen die kälteinduzierte Apoptose (RAUEN et al., 1997). Erklären lässt sich dieser Effekt hauptsächlich durch das in dieser Kardioplegielösung in hoher Konzentration vorkommende Histidin.

Mit der HTK-Lösung als Konservierungslösung beschäftigten sich ebenfalls LAMESCH und Mitarbeiter (1990). Sie konnten in experimentellen Studien zeigen, dass Ischämiezeiten am Gesamtorgan Herz bis zu 24 Stunden möglich sind. Die Effizienz der HTK-Lösung sahen sie in ihrer spezifischen chemischen Zusammensetzung, basierend auf Histidin, Tryptophan und α -Ketoglutarat.

Die HTK-Lösung zeigte nach Auswertung unserer Ergebnisse nach einer 24-stündigen Kaltinkubation mit anschließender Wiedererwärmungsphase in Vergleichen mit Trolox, Desferal, LK 614 und LK 616 bezüglich des Hyperkontraktionsverhaltens an isolierten Herzmuskelzellen keinen signifikanten Unterschied.

Lediglich die Zelllängenversuche im Vergleich mit Na30 zeigen einen deutlichen Unterschied in der Auswertung und damit bessere Konservierungsergebnisse. Demzufolge schnitten die mit HTK behandelten Zellen bezüglich der Zellkontraktion deutlich besser ab.

Negativ zu bewerten sind die Versuchsergebnisse der HTK-Lösung versus Na^+ -Ionen in Wiedererwärmungsversuchen. Dabei zeigte sich nach 20-stündiger Inkubation mit Na30La ein minimaler Anstieg an hyperkontrahierten Zellen, in der zu vergleichenden Versuchsserie mit HTK-Lösung jedoch ein deutlicher Anstieg an hyperkontrahierten Zellen. Na^+ -Ionen scheinen demnach in Wiedererwärmungsversuchen bessere Konservierungsergebnisse aufzuweisen.

5.6.2 Radikalfänger als Konservierungsmittel (Trolox)

Obwohl Sauerstoff für die aeroben Organismen ein lebenswichtiges Element darstellt, ist der molekulare Sauerstoff funktionsbeeinträchtigend. Reaktive Sauerstoffradikale sind von großer Bedeutung bei verschiedenen Formen der Zellschädigung. Die über reaktive Sauerstoffspezies vermittelte Zellschädigung (ROS) wurde bereits durch mehrere klinische Studien bestätigt (SALAHUDEEN et al., 2000; VAIRETTI et al., 2004).

Sauerstoffradikale zeichnen sich durch eine hohe Reaktionsfreudigkeit und der damit verbundenen chemischen Aggressivität aus. Unter den verschiedenen existierenden Sauerstoffspezies wie z.B. das Superoxyd-Radikalanion O_2^- , Wasserstoffperoxyd H_2O_2 , Hydroxylapatit $\cdot OH$ und das Singulett-Sauerstoff 1O_2 , ist das Hydroxyl-Radikal $\cdot OH$ eines der aggressivsten existierenden Sauerstoffradikale.

Radikalfänger sind enzymatisch wirkende Substanzen, die der Produktion von Antioxidantien und Radikalen entgegen wirken. Als wichtigster Vertreter der nicht-enzymatisch wirkenden Substanzgruppen ist das Vitamin C zu nennen. Seine Wirkung beruht als Co-Faktor für α -Tocopherol (Vitamin E). Ein in der Studie verwendeter Radikalfänger ist Trolox, eine nicht-enzymatisch wirkende, wasserlösliche, synthetische Form des Vitamin E. Der Wirkmechanismus von Trolox beruht auf der Blockierung der Lipidperoxidationsketten durch den Wirkstoff α -Tocopherol. Dadurch werden die Peroxylradikale in Lipidperoxyde umgewandelt, das dadurch entstehende Tocopherol-Radikal wird durch die Ascorbinsäure zu Tocopherol reoxidiert.

Unsere Versuchsserie begann mit einer vergleichenden Warm- bzw. Kaltinkubation mit CCT als Konservierungsmittel unter Zugabe der Eisenchelatoren LK 614, LK 616 und Desferal sowie dem Antioxidans Trolox. Die unter Kaltinkubation mit Desferal inkubierten Kulturen wiesen mit ca. 50% den höchsten Anteil an hyperkontrahierten Zellen auf. Die Testmedien LK 614 und LK616 wiesen ebenfalls keinen signifikanten positiven prozentualen Anteil an intakten stäbchenförmigen Myokardzellen auf. Einzig positiv viel in dieser Versuchsserie der Testzusatz Trolox auf, mit einem prozentualen Anteil von 10% hyperkontrahierten Zellen. Die sich anschließende Untersuchung bezüglich des Hyperkontraktionsverhaltens bei Kaltinkubation und anschließender Erwärmung ergab, dass die mit Trolox inkubierten Zellen erst einen

signifikanten Anstieg an runden Zellen nach Kaltinkubationszeiten nach 20 Stunden zeigen, während sich bei den Kontrollzellen ein kontinuierlicher Anstieg beobachten ließ. Ähnlich positiv waren auch die Versuchsserien mit dem Antioxidans Trolox bezüglich des Verhaltens der Zelllängen isolierter Herzmuskelzellen. Um den Einfluss der 24-stündigen Kaltinkubation der Rattenmyokardzellen mit Trolox im Kulturmedium CCT mit anschließender Erwärmung auf das Kontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden die Zellen mit Trolox inkubiert und am darauffolgenden Tag elektrisch stimuliert. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen zeigte sich bei den mit Trolox inkubierten Zellen eine deutlich erhöhte Kontraktionsbereitschaft.

Der optimale Konzentrations-Wirkungsbereich von Trolox liegt im Bereich von 0,01 bis 1 mMol/l, es zeigte sich bei einer Konzentration von 1 mMol/l ein Wert von ca. < 2% an hyperkontrahierten Zellen.

Jedoch beobachteten wir nach einer 24-stündigen Warminkubation mit Trolox, mit Werten von über 30%, einen erhöhten Anteil an hyperkontrahierten Zellen. Trolox weist demzufolge eine signifikant schädigende Wirkung bei Warminkubation auf. Um zu differenzieren, ob es sich bei den hyperkontrahierten Zellen um nekrotische oder apoptotische Zellgebilde handelt, wurden die Myokardzellen mit Trolox inkubiert und mittels HOE-Färbung das apoptotische bzw. nekrotische Verhalten dargestellt. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wiesen die mit Trolox inkubierten Zellen einen signifikant höheren Anteil an apoptotischen Zellen auf, als die mit dem Kontrollmedium CCT behandelten Zellen.

5.6.3 Eisenchelatoren als Konservierungsmittel (Desferal, LK 614 und LK 616)

Die strategisch wichtige Rolle der Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies wurde bereits in Kapitel 5.3.2 erläutert.

Bereits existierende Studien zeigten, dass reaktive Moleküle wie z. B. Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) durch eine chemische Reaktion mit Eisen, insbesondere niedermolekulares komplexiertes Eisen, katalysiert und in hochreaktive Radikale umgewandelt werden kann (RAUEN et al. 1997). Die Quelle des chelatisierbaren, freien Eisens bzw. dessen Ursprung ist bisher noch nicht wissenschaftlich geklärt. Als wahrscheinlich gelten die Lysosomen. Der Anstieg des freien Eisens führt in

seiner Folge zu einer Oxidation reduzierten Gluthathions (GSH), zu reduziertem NADH bzw. NADPH und einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mit nachfolgend gestörter Kalziumhomöostase zu einem mitochondrialen Zelluntergang unter Beteiligung der Mitochondrien.

Studien der Universität Essen bewiesen, dass bei einer hypothermen Konservierung der Leber und den damit verbundenen Kältezellschäden, aufgrund einer Störung der intrazellulären Eisenhomöostase, durch Eisenchelatoren vollständig unterdrückt werden kann (RAUEN et al., 1997). Wyllie und Mitarbeiter belegten wissenschaftlich einen Anstieg des chelatisierbaren Eisens bei Kaltischämie am Gesamtorgan Leber (WYLLIE et al., 1980).

Huang und Mitarbeiter demonstrierten, dass sich durch Zugabe des Eisenchelators Deferoxamin zur Konservierungslösung die Schädigung des Gesamtorgans Niere durch kalte Lagerung erheblich vermindern lässt (HUANG et al., 2003).

Wenig Übereinstimmung in Bezug auf eine Reduzierung bzw. Unterdrückung von Kältezellschäden durch Eisenchelatoren zeigten unsere Versuche. Vergleichende Versuche mit dem Antioxidans Trolox zeigten nach 20-stündiger Kaltinkubation bessere Versuchsergebnisse bezüglich der Hyperkontraktion als die mit Eisenchelatoren behandelten Zellen. Die unter Kaltinkubation behandelten Myokardzellen mit Desferal wiesen mit ca. 50% den höchsten Anteil an hyperkontrahierten Zellen auf. Die Testmedien LK 614 und LK 616 wiesen keinen spürbaren positiven prozentualen Anteil an intakten stäbchenförmigen Zellen auf. Trolox scheint unseren Ergebnissen nach, mit einem Anteil von 10% an hyperkontrahierten Zellen, besser zu konservieren.

Unter einer 24-stündigen Warminkubation wiesen die mit Eisenchelatoren behandelten Myokardzellen mit Werten unter 10% an hyperkontrahierten Zellen keine deutlichen Unterschiede in der Auswertung, das Antioxidans Trolox differenzierte sich deutlich mit einem Wert von über 30%.

5.6.4 Einfluss von Natriumionen auf das Konservierungsverhalten

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation war nicht auf das Testergebnis der Na⁺-Ionen gerichtet, vielmehr standen die Eisenchelatoren und Antioxidantien im

Mittelpunkt des Interesses. Umso überraschender war deshalb das Ergebnis der Versuchsserien mit Na^+ -Ionen. In vielen Versuchen bewiesen sie sich als durchaus erfolgsversprechend.

Der Einfluss einer 24-stündigen Kaltinkubation mit Na^+ -Ionen und anschließender Wiedererwärmung im Kulturmedium CCT auf das Hyperkontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen zeigte, dass in der Versuchsserie mit Na30La und den Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an hyperkontrahierten Zellen bestand, nach 20-stündiger Inkubationszeit erfolgte ein minimaler Anstieg an hyperkontrahierten Zellen in der Na30La-Kurve. Vergleichende Versuche mit der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung zeigten signifikant schlechtere Ergebnisse. Die Untersuchungen des Einflusses von Na^+ -Ionen bei Kaltinkubation und sich anschließender Erwärmung auf die Zelllänge isolierter Herzmuskelzellen, zeigte einen erniedrigten Wert an Zelllängenparameter im Vergleich zur HTK-Lösung. Hingegen nach gleichen präkonditionierenden Versuchsbedingungen zeigten Untersuchungen bezüglich der Zellverkürzungsparameter unter elektrischer Stimulation keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse im Vergleich mit HTK.

In der vorliegenden Studie wurde eine natriumarme Lösung (Na30) verwendet. Verhindert werden sollte damit eine Natriumüberladung durch Hypothermie. Als Hauptursache für die Natriumüberladung der hypothermen Zellen wird eine verminderte Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität vermutet (BELZER et al., 1988; BLANKENSTEIJN et al. 1991; CLAVIEN et al., 1992; HOCHACHKA et al. 1986). Die dadurch verursachte Überladung der Zellen mit Natrium wird für die Bildung von Gewebeödemen verantwortlich gemacht. Eine Hemmung des Enzyms konnte in verschiedenen Modellen bereits nachgewiesen werden (KIMZEY et al., 1971, MARTIN et al., 1972). Allerdings kann nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass Hypothermie per se zu einer Natriumüberladung führt. So zeigten FUCKERT und Kollegen (2000), dass Natriumüberladung bei der Hypoxie aber nicht bei der hypothermen Zellschädigung von Leberendothelzellen und Hepathozyten beteiligt ist. Die Ergebnisse der hier erarbeiteten Untersuchungen deuten aber auf eine Natriumüberladung der Herzmuskelzellen unter Hypothermie hin. Ähnlich der hypothermen Zellschädigung spielen Natriumionen auch bei der posthypoxischen Zellschädigung der Herzmuskelzellen eine bedeutende Rolle (SCHÄFER et al., 2000; RUIZ-MANEA et al., 2000).

5.7 Diskussion der Hauptbefunde

Als erfolgversprechend erwies sich zu Beginn der Versuchsserie das Antioxidans Trolox. Etablierte wissenschaftliche Untersuchungen der Universität Essen, ließen eine eventuelle Übertragbarkeit der Ergebnisse von Leber- und Nierenendothelzellen auf Myokardzellen erhoffen. Untersuchungen der Kaltinkubation mit sich anschließender Warminkubation, der Zellverkürzungsparameter und der Zelllängenparameter zeigten durchaus beachtliche Ergebnisse.

Jedoch beobachteten wir im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen nach einer 24-stündigen Warminkubation mit Trolox, mit Werten von über 30%, einen erhöhten Anteil an hyperkontrahierten Zellen. Trolox weist demzufolge eine signifikant schädigende Wirkung bei Warminkubation auf. Die Ergebnisse unserer Studie ergaben keinen direkten Vorteil des Kältezellschutzes durch Trolox, sowohl die strukturelle Morphologie als auch die Funktionstüchtigkeit der Myokardzellen waren den mit Na^+ -Ionen und HTK-Lösung inkubierten Myokardzellen deutlich überlegen. Es sollte deshalb festgehalten werden, dass sich die bereits durchgeführten Studien an Leber- und Nierenendothelzellen und die theoretischen Kenntnisse über Trolox in vorliegender Studie nicht in einem klinischen Vorteil niederschlagen.

Die Konservierungslösungen mit niedrig dosierten Natriumionen hingegen zeigten überraschenderweise gute Ergebnisse. Die ausgewerteten Myokardzellen dieser Versuchsgruppe wiesen, nach 12-stündiger Kaltischämie und einer sich anschließenden 6-stündigen Warmischämie, eine durchschnittlich höhere Überlebensrate auf, als die im Vergleich angewendeten Lösungen HTK bzw. Kontrolllösungen (siehe Ergebnisteil Kapitel 4).

Die Inkubation der Myokardzellen in der Versuchsgruppe der Eisenchelatoren, repräsentiert durch die Testzusätze Desferal, LK 615 und LK 614, zeigten entgegengesetzt aller positiven Hoffnungen, schlechte vergleichende Untersuchungsergebnisse. Dies spiegelte sich deutlich in Untersuchungen der Hyperkontraktion nach Kaltinkubation wieder. Einzig positiv erwiesen sich die Versuche mit Kaltinkubation und sich anschließender Warminkubation. Hier zeigte sich die zumindest nicht schädigende Wirkung der Eisenchelatoren bei Warminkubation. Es bleibt festzuhalten, dass Eisenchelatoren auf Leber- und

Nierenendothelzellen einen Kältezellschutz aufweisen, bei Myokardzellen hingegen blieb dieser Schutzeffekt aus.

5.8 Schlussfolgerungen aus den Experimenten

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse gezeigt werden, dass die Restitution kaltischämisch vorbehandelter Rattenmyokardzellen mit sich anschließender Hyperthermie durch Na30 möglich ist. Na30 konnte sich diesbezüglich in abschließenden Versuchsergebnissen von anderen Konservierungslösungen signifikant positiv unterscheiden. Des weiteren konnten nach Hypothermie- und Hyperthermieversuchen keine merkbare Funktionsminderung der Myokardzellen festgestellt werden (siehe Kapitel 4 Ergebnisse).

Es bleibt zu vermuten, dass die unerwartet positiven Ergebnisse bezüglich des Schutzes der Kältezellschädigung durch Na^+ -Ionen als multifaktorielles Geschehen auf einer zum Teil molekularen Ebene stattfindet, welche sich mit den hier verwandten Methoden nicht darstellen lässt. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sollten weitere Versuche durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Organkonservierung stellt einen wichtigen Schritt in der Transplantationsmedizin dar.

Die Weiterentwicklung der Transplantationsmethoden stehen auch heute noch im Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Ziele sind unter anderem eine Minimierung des Ischämie-Reperfusionsschadens sowie eine Weiterentwicklung der Kardioprotektionslösungen. Möglichkeiten zur optimalen Organkonservierung sind Hypothermie und geeignete Konservierungslösungen. Doch wie Studien der Universität Essen wissenschaftlich belegen, ist Hypothermie selbst ein zellulär schädigender Faktor, ausgelöst durch kälteinduzierte Apoptose an Leber- und Nierenendothelzellen (RAUEN et al., 1997).

Untersucht werden sollte darauf basierend der Vorgang der Kaltischämie mit Folgeschäden und deren Verhinderung auf zellulärer Ebene an Myokardzellen im Tierexperiment. Es sollte geklärt werden, ob die durchgeführten Versuche an Leber- und Nierenendothelzellen auf Myokardzellen übertragbar und inwieweit Vergleiche mit etablierten Versuchsmodellen möglich sind (DE GROOT et al., 1995. RAUEN et al.) und ob Eisenchelatoren, Radikalfänger oder Na^+ -Ionen protektive Wirkung bei Kaltischämie zeigen.

Dazu wurden Rattenmyokardzellen mit unterschiedlich zusammengesetzten Konservierungslösungen unter Hypothermie bei 4°C mit Wiedererwärmungsphasen bei 37°C inkubiert. Eingesetzt wurden Eisenchelatoren, Natriumlösungen (mit niedrigem Na^+ -Gehalt) und Radikalfänger.

Sehr gute Ergebnisse zeigte zu Beginn unserer Versuchsserie das Antioxidans Trolox. Unter Bezugnahme auf wissenschaftliche Studien der Universität Essen ließen eine eventuelle Übertragbarkeit der Ergebnisse, durchgeführt an Leber- und Nierenendothelzellen, auf Myokardzellen erhoffen. Kaltinkubationsversuche mit einer anschließenden Wiedererwärmungsphase zeigten gute Ergebnisse. Im weiteren Verlauf zeigten sich jedoch Mängel in Bezug auf eine 24-stündigen Warminkubation. Trolox zeigte demnach eine signifikant schädigende Wirkung bei Warminkubation.

Sowohl die Zellmorphologie als auch die Funktionstüchtigkeit der Zelle waren bei mit Na^+ -Mangel und HTK-Lösung deutlich besser.

Als schlecht erwies sich auch die Gruppe der Eisenchelatoren. Deutlich wurde dies durch die Untersuchungen der Hyperkontraktion nach Kaltinkubation. Einzig positiv blieben an dieser Stelle die Versuchsauswertungen bei Kaltinkubation mit anschließender Warminkubation. Hier zeigte sich zumindest eine nichtschädigende Wirkung der Eisenchelatoren bei Warminkubation. Ein Vergleich der protektiven Wirkung von Eisenchelatoren bei Leber- und Nierenendothelzellen bleibt leider aus.

Die Testzusätze mit Na^+ -Mangel, speziell Na 30, zeigten, im Vergleich mit anderen Testzusätzen, überraschenderweise gute Ergebnisse. Die ausgewerteten Myokardzellen zeigten nach einer 12-stündigen kaltischämischen Phase und einer sich anschließenden 6-stündigen Warmischämie hohe Überlebensraten. Es konnten in Nachuntersuchungen keine signifikante Funktionsminderungen der Myokardzellen festgestellt werden.

Letztendlich besteht jedoch die Vermutung, dass das in dieser Versuchsserie herausgefundene protektive Verhalten der Na^+ -Ionen auf Rattenmyokardzellen durch als ein multifaktorielles Geschehen angesehen werden sollte, welche sich mit den hier verwandten Methoden nicht darstellen lässt. Zur exakten Aufklärung dieses protektiven Verhaltens müssen weitere Versuche folgen, um weitere Erkenntnisse zu erhalten.

Auch mit Abschluss dieser Dissertation ist die Antwort auf eine optimale Konservierungslösung nicht vollständig geklärt, aber auch folgende Versuchsserien tragen sicherlich positiv zum Erlangen weiterer nutzbarer Erkenntnisse bei.

7 Summary

Organ conservation can be seen as an important step in transplantation medicine. Improving the methods of transplantation is still in the centre of scientific interest. Minimization of ischemic reperfusion damage as well as the improvement of cardioprotective solutions are some of the aims. An ideal organ conservation can be achieved by using hypothermia or adequate conservation solutions. Even hypothermia as is self is a cellular toxic factor, initiated by cold-induced apoptosis, as shown in scientific studies on liver- and kidney endothelium cells, accomplished at Essen University (RAUEN et al., 1997)

The process of cold-ischemia associated with consequential damage and its prevention were to be examined on cellular level using myocardic cells in animal test. Either transferability of the accomplished trials with liver- and kidney endothelium cells onto myocardic cells were of further interest. Furthermore it should be cleared, in how far comparisons to established experimental methods are possible (DE GROOT et al., 1995. RAUEN et al.) and if there is an protective impact of iron chelators, scavengers or sodium ions during cold-ischemia.

For that purpose rat myocardic cells were incubated in differently composed conservation solutions under hypothermia at 4° C and phases of rewarming at 37°C. Iron chelators, sodium solutions (low concentration of sodium ions) and scavengers were used.

Very positive results were shown by the antioxidant Trolox at the beginning of our trial series. Relating to studies by Essen University a potential transferability of these results, found on liver- and kidney endothelium cells onto myocardic cells could be expected. In further progression deficiencies relating to 24-hour-warm incubation appeared. Trolox showed a significantly affecting impact during warm incubation. Cell morphology as well as cell's functional efficiency were much better using sodium-deficiency and HTK-solution.

Even the group iron-chelators provided negative results, shown while testing hypercontraction after cold-incubation. Whereas the test results of cold incubation followed up by warm incubation could provide positive results: It could be shown, that there was no affecting impact on iron-chelators during warm incubation. A comparison

of the protective effect of iron chelators on liver- and kidneyendothelium cells is to be missing.

The testing agents with a lack of sodium, especially Na₃O, showed comparing to other agents surprisingly good results. Analysed myocardic cells showed a high survival rate after a 12-hour coldischemic phase followed up by warmischemia, lasting for 6 hours. Follow-up examinations could not show a significant lack of functional efficiency of the myocardic cells.

Finally we suppose, that the sodium ion's protective effect on rat-myocardic cells should be seen as a multifactorial process, which cannot be demonstrated significantly by the used methods.

Literaturverzeichnis

AMRANI M, YACOUB MH, ROYSTON D (1999)

Myocardial protection for cardiac surgery: classical views and new trends. *Int Anesthesiol Clin*; 37: 39-53

ASHKENAZI A, DIXIT VM (1998)

Death receptors: signalling and modulation. *Science*; 281:1305-1308

BARNARD CN (1967)

The operation. A human cardiac transplant – an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Capetown, South Africa. *S-Afr-Med-J*; 41:1271-1274

BELZER FO, SOUTHARD JH (1988)

Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*; 45: 673-676,

BLANKENSTEIJN JD, TERPSTRA OT (1992)

New aspects of heterotopic liver transplantation. *Transpl. Int.*; 5: 43-50

BRETSCHNEIDER HJ (1992)

Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz. In: *Jahrbuch 1991 der Deutschen Akademie der Naturforscher. Leopoldina, Halle (Saale)*, S. 161-174

CARREL A, GUTHRIE CC (1905)

The Transplantation of organs and organs, *Am Med* 1905 / CARREL A, HOPKINS J, *Hospital Bull*; p 25

CLAVIEN PA, HARVEY PRC, STRASBERG SM (1992)

Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation*; 53: 957-978

COLLINS GM, BRAVO-SHUGARMAN M, TERASAKI PI (1969)

Kidney preservation for transportation. *Lancet* ; 2 : 1219-22

DE GROOT H, IOANNIDIS I, RAUEN U (1996)

Tissue injury by free radicals and the protective effect of flavonoids. In: Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.; 18 (Suppl. B): 23-25

DE GROOT H, IOANNIDIS I, RAUEN U (1995)

Reaktive Sauerstoffspezies. In: Dargatzis, R. (Hg.) Entzündung. Wiesbaden: Ullstein Mosby, S. 116-122

DE GROOT H, RAUEN U, ERHARD J (1995)

Freie Radikale und Transplantation. In: HÖTZEL D, WALTER P (Hg.) Sauerstoff: Nutzen und Gefahren. Bingen: Ganymedes; S. 41-51

DE GROOT H, RAUEN U, IOANNIDIS I, ERHARD J (1995)

Rolle freier Radikale bei Lebererkrankungen. In: BEGER HG, MANN MP, GRETEN H, (Hg.) Molekularbiologische Grundlagen der Gastroenterologie. Heidelberg: Springer; S. 294-301

ELLIS RE, YUAN J, HORVITZ R (1991)

Mechanism and functions of cell death. Annu Rev Cell Biol; 7: 663-698

EPPINGER MJ, JONES ML, DEEB M, BOLLING SF, WARD PA (1995)

Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat. J. Surg. Res. ; 58 : 713-718

FUCKERT O, RAUEN U, DE GROOT H (2000)

A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK1 cells.

Transplantation; 70: 723-730

GOLD R, SCHMIED M, GIEGERICH G, BREITSCHOPF H, HARTUNG HP, TOYKA KV, LASSMANN H (1994)

Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab Invest; 71:219-225

GRACE PA (1994)

Ischaemia-reperfusion injury. Br. J. Surg. ; 81, 637-647

HARDESTY RL, GRIFFITH BP (1987)

Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.; 93: 11-18,

HARDY J D, CHAVEZ CM, KURRUS FE, NEELY WA, WEBB WR, ERASLAN S, TURNER MD, FABIAN LW, LABECKI JD (1964)

Heart transplantation in man. Developmental studies and report of a case. Jama; 188: 1132-1140

HELLBERG K (1987)

Klinik der globalen Ischämie des Herzens. Z. Kardiologie. 76 Suppl.; 4: 25-30

HEUSCH G, SCHULZ R (1997)

Endogenous protective mechanisms in myocardial ischemia: hibernation and ischemic preconditioning. Am J Cardiol; 80: 26A-33A

HOCHACHKA PW (1986)

Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science; 212: 509–514

HUANG H, HE Z, ROBERTS J, SALAHUDEEN AK (2003)

Deferoxamine reduces cold-ischemic renal injury in a syngeneic kidney transplant model.

Am J Transplant; 3: 1531–1537

JAMIESON NV, SUNDBERG R, LINDELL S, CLAEISSON K, MOEN J, VREUGDENHILL PK, WIGHT DGD, SOUTHARD JH, BELZER FO (1988)

Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. Transplantation; 46: 517-522

KIM JD, BAKER CJ, DANTO SI, STARNES VA, BARR ML (2000)

Modulation of pulmonary Na⁺-pump gene expression during cold storage and reperfusion. Transplantation; 70: 1016-1020

KIMBLAD PO, SJÖBERG T, MASSA G, SOLEM JO, STEEN S (1991)

High potassium contents in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasoconstriction. Ann. Thorac. Surg.; 52: 523-528

KIMZEY SL, WILLIS JS (1971)

Temperature adaption of active sodium-potassium transport and of passive permeability in erythrocytes of ground squirrels. J Gen Physiol; 58: 634-649

KIRK AJB, COLQUHOUN IW, DARK JH (1993)

Lung preservation: A review of current practice and future directions. Ann. Thorac. Surg.; 56: 990-1000

KROEMER G, ZAMZANI N, SUSIN SA (1997)

Mitochondrial control of apoptosis. Immunol today; 18: 44-51

LAMESCH P, RAYGROTZKI S, KEHRER G, GUBERNATIS G, BRETSCHNEIDER HJ, PICHLMAYR R (1990)

Preservation of the liver with the HTK solution. Transpl proc; 22: 518-519

LOWER RR, SHUMWAY NE (1960)

Studies in orthotopic homotransplantation of the canine heart. Surg Forum; 11: 18-19

MAJNO, GUIDO, JORIS, ISABELLE (1995)

Apoptosis, Oncosis and Necrosis. American Journal of Pathology ; 146 (1): S. 3-15

MARTIN DR, SCOTT DF, DOWNES GL, BELZER FO (1971)

Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: Cold sensitivity of the ATPase system. Ann Surg; 175: 111-117

MENASCHE P, PRADIER F, PEYNET J, GROUSSET C, MOUAS C, BLOCH G, PIWNICA A (1991)

Limitation of free radical injury by reduced glutathione: An effective means of improving the recovery of heart transplants. Transplant. Proc.; 23: 2440-2442

NOVICK RJ, MENKIS AH, MCKENZIE FN (1992)

New trends in lung preservation: A collective review. J. Heart Lung Transplant.; 11: 377-392

RAUEN U, ELLING B, GIZEWSKI ER, KORTH H-G, SUSTMANN R, DE GROOT H (1997)

Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. Free Radic Biol Med; 22: 17-24

RAUEN U, REUTERS I, FUCHS A, DE GROOT H (1997)

Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. Hepatology; 26:351-357

RAUEN U, DE GROOT H (1998)

Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. Free Radic Biol Med; 24:1316-1323

REICHENSPURNER HC, RUSS BM, MEISER G, NOLLERT C, WEINHOLD UB, REICHART (1993)

University of Wisconsin Solution for myocardial protection in heart transplantation – A comparison with HTK. Transplant. Proc. 25; No. 6: 3042-3043

RUIZ-MEANA M, GARCIA-DORADO D, JULIA M, INSERTE J, SIEGMUND B, LADILOV Y, PIPER HM, TRITTO FP, GONZALEZ MA, SOLER-SOLER J (2000)

Protective effect of HOE642, a selective blocker of Na⁺-H⁺ exchange, against the development of rigor contracture in rat ventricular myocytes. Exp Physiol; 85: 17-25

SALAHUDEEN AK, HUANG H, PATEL P, JENKINS JK (2000)

Transplantation; 70: 1424-1431

SCHÄFER C, LADILOV Y, SCHÄFER M, PIPER HM (2000)

Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca²⁺ overload and acidosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279: H2143-H2150

SCHLÜTER KD, LANGER M, LÜTTECKE D (2003)

Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. Eur J Physiol; 447: 289-297

SCHLÜTER KD, SCHREIBER D (2005)

Adult ventricular cardiomyocytes. Helgason/Miller; 20: 284-3/545-1

SINGER D, BRETSCHNEIDER HJ (1990)

Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples – part 1 and part 2. Thorac Cardiovasc Surg 38: 205-219

SMITS JM, VANHAECKE J, VRIES E, ROELS L, PERSIJN G, LAUFER G (2006)

Waiting for a thoracic transplant in Eurotransplant. Transpl. Int.; 19: 54-66

STEFFEN R, KROM RAF, FERGUSON D, LUDWIG J (1990)

Comparison of University Wisconsin and Euro-Collins preservation solutions in a rat liver transplant model. In: Transplantation International (3): 133-136

VAIRETTI M, STORTO M, BATTAGLIA G, GRADINI R, BRUNO V, NICOLETTI F (2004)

Mouse hepatocytes lacking mGlu5 metabotropic glutamate receptors are less sensitive to hypoxic damage. Eur J Pharmacol; 497: 25-27

WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR (1980)

Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol; 68: 251-307

YACOB MH, KHAGHANI A, BANNER N, TAJKARIMI S, FITZGERALD M (1989)

Distant organ procurement for heart and lung transplantation. Transplant Proc; 21: 2548-50

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne erlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Stephanie Volk

Danksagung

Mein Dank gilt einer Vielzahl von Menschen, die mir geholfen haben, diese Arbeit anzufertigen, mich auf dem Weg zur Promotion begleitet haben und an dieser Stelle nicht namentlich genannt werden.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Schlüter für die spontane Übernahme und unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit aussprechen, der mir stets freundlich, zielgerichtet, kompetent und hilfsbereit bei der Ausführung und Bearbeitung meiner Arbeit Unterstützung angeboten hat.

Außerdem möchte ich mich bei den technischen Assistenten des Physiologischen Institutes für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Materie, die geduldige Betreuung und die stete, auch kurzfristige Bereitschaft zur Diskussion und Kritik bedanken. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Nadine Woitasky.

Für die tatkräftige Hilfe und die Geduld bei der Anfertigung zahlreicher Präparate danke ich Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter.

Marc Bäuerle, Steffen Kaubrügge, Holger Böser, Hartmut und Regina Scheld danke ich besonders für ihre unermüdliche, stets gutgelaunte Hilfsbereitschaft in Sachen EDV und Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie für ihre moralische und mit leichtem Nachdruck versehene Unterstützung herzlich danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stephanie Volk
Geburtsdatum	07. April 1978
Geburtsort	Lahn-Gießen
Familienstand	Ledig

Schul Ausbildung

08.1994-05.1997	Gymnasiale Oberstufe Goetheschule Wetzlar Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-----------------	---

Berufsausbildung

09.1997-03.1999	Ausbildung zur Medizinisch Technischen Assistentin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
-----------------	---

Hochschulstudium

04.1999-07.2005	Studium der Zahnmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen Abschluss: Approbation zur Zahnärztin im Juli 2005
-----------------	---

Berufspraxis und Praktika

09.2005-03.2006	Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis Träger in Butzbach
seit 03.2006	Weiterbildungsassistentin im Fach Oralchirurgie der Philipps- Universität-Marburg, Abt. für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie, Leiter: Prof.Dr.Dr. K.H. Austermann

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5076-2



9 783835 195076 4